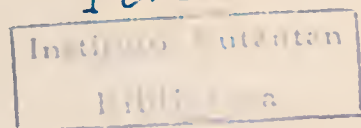
MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

1949

TOMO XXII

São Paulo, Brasil
Caixa Postal 65

As "MEMORIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" são destinadas à publicação de trabalhos realizados no instituto ou com a sua contribuição. Os trabalhos são dados à publicidade, separadamente, logo após a entrega e reunidos anualmente num volume.

Serão fornecidas, a pedido, separatas dos trabalhos publicados nas "Memorias", pedindo-se nesse caso o obsequio de enviar outras separatas, em permuta, para a Biblioteca do instituto.

Toda a correspondencia editorial deve ser dirigida ao:

INSTITUTO BUTANTAN
Biblioteca
Caixa postal 65
S. Paulo, BRASIL.

PEDE-SE PERMUTA
EXCHANGE DESIRED.

ÍNDICE

1. BÜCHERL, W. — Descrição do macho de *Magulla symmetrica* Bücherl, 1949 ... 1-10
Description of the male of Magulla symmetrica Bücherl, 1949.

2. BÜCHERL, W. & NAVAS, JOSÉ — Descrição dos machos das especies de *Tityus lutzi* Giltay, 1928 e *Tityus costatus* (Karsch, 1879) (Género *Tityus* C. L. Koch, 1836; subfam. *Isometrinae* Birula, 1917; fam. *Buthidae*, 1879) ... 11-24
Description of the males of the species of Tityus lutzi Giltay, 1928 and Tityus costatus (Karsch, 1879) (Genus Tityus C. L. Koch, 1836; subfam. Isometrinae Birula, 1917; fam. Buthidae, 1879)..

3. AZEVEDO, M. P. — Mecanismo de acção anticoagulante do *latex* de *Ficus glabrata* K. B. K. ... 25-30
Mechanism of the anti-coagulant action of the latex from Ficus glabrata K. B. K.

4. AZEVEDO, M. P. & MARTIRANI, I. — Acção proteolitica do veneno da *Bothrops jararaca* (Wied). I. Acção sobre hemoglobina e caseina .. 31-46
Proteolytic action of the venom of Bothrops jararaca (Wied). I. About the action on hemoglobin and casein.

5. MARTIRANI, I. & AZEVEDO, M. P. — Acção proteolitica do veneno da *Bothrops jararaca* (Wied). II. Acção sobre a gelatina ... 47-62
Proteolytic action of the venom of Bothrops jararaca (Wied). II. About the action on gelatine.

6. LEAO, A. T. — Sobre dois batráquios da Ilha dos Alcatrazes ... 63-74
On two Batrachia from the Alcatrazes Island.

7. HÖXTER, G. & MUNGIOLI, R. — Estudos electroforéticos. I. Métodos e técnica ... 75-126
Electrophoretic studies. I. Methods and technic.

8. MACEDO, J. J. & VELLINI, L. L. — O uso da novocaina intravenosa como analgésico na colheita da linfa vacinica ... 127-138
The use of the intravenous novocaine as analgesic in the harvesting of the the vaccine lymph.

9. LEAO, A. T. — Sobre dois batráquios da Ilha da Queimada Grande ... 139-150
On two Batrachia from the Queimada Grande Island.

10. HOGE, A. R. — Notas erpetológicas. 7. Fauna erpetológica da ilha da Queimada Grande ... 151-172
Notes on Herpetology. 7. Herpetologic fauna from the Queimada Grande Island.

11. BÜCHERL, W. — Quilópodos do Perú. II. 173-186
Chilopoda from Perú. II.

12. BÜCHERL, W. — Quilópodos da Venezuela. I. 187-198
Chilopoda from Venezuela. I.

13. AMARAL, J. P. do & ESTEVES, M. B. — Antigenos de *Salmonella* em bacilo Flexner II. 199-204
Salmonella antigens in Flexner bacillus II.

14. AMARAL, J. P. do & AGUIAR, A. A. — Reacções da precipitina em alguns Culicidas 205-212
Precipitin reactions in some Culicidae

Mem. Inst. Butantan,
22:1-10. Nov.º 1950.

DESCRIÇÃO DO MACHO DE *MAGULLA SYMMETRICA* BÜCHERL, 1949

POR WOLFGANG BÜCHERL

*(Trabalho da Divisão de Zoologia do Instituto Butantan,
São Paulo, Brasil)*

INTRODUÇÃO

Em nosso trabalho "Estudos sôbre o gênero *Magulla* Simon, 1892" fizemos uma nova redescrição do gênero, como também das duas, até então, únicas espécies, *M. obesa* Simon e *M. janeira* Keyserling. Finalmente, foi descrita a *Magulla symmetrica* como nova para a ciência, estabelecendo-se um diagnóstico diferencial morfológico rigoroso entre estas três espécies, únicas do gênero.

Entretanto, as relações das dimensões do cefalotorax, das patelas e tibias do primeiro e do quarto par de pernas que permitiram elaborar uma chave distinta das três espécies, baseada ainda em outros caracteres constantes e no colorido geral, só se baseavam em fêmeas, porque também na nossa espécie nova faltava o macho, tendo acontecido o mesmo a Simon e Keyserling. Realmente os machos das espécies de *Magulla* devem ser raríssimos, porque entre os milhares de exemplares de aranhas recebidos anualmente pelo Instituto Butantan, nunca nos chegou às mãos um só macho. Desta maneira continuaria este gênero, tão interessante, quando em março de 1949, a sra. Helga Urban trouxe da Ilha de São Sebastião, Estado de São Paulo, 3 machos, capturados no mesmo local de onde vieram as fêmeas de *Magulla symmetrica*, e que invariavelmente, pertencem a esta mesma espécie e que serão descritos a seguir.

Magulla symmetrica Bucherl, 1949.

Descrição do macho:

Medidas: — cefalotorax 7 mm de comprimento por 7 mm de largura;
comprimento total 17mm;
comprimento das pernas: — 25:22:18,5: 27 mm (num macho menor: 21,5:18,8:15:23 mm);
patela e tibia I — 10 mm (8,5 mm no exemplar menor);
patela e tibia IV — 8 mm (8,0 mm no exemplar menor);

Entregue para publicação em 3 de junho de 1949.

metatarsos e tarsos I-3.2 e 3,3 mm; II-3,3 e 3,2 mm; III-3,5 e 2,5 mm; IV-7 e 3,5 mm;
esterno — 3 por 3 mm;
labio — 1 por 1,2 mm.

Colorido: — (vide prancha). O colorido do macho é igual ao da fêmea, isto é, marrom claro, um tanto para o vermelho nas pernas e nos palpos e mais para o marrom escuro no cefalotorax e, principalmente, na face dorsal do abdomen. Esterno, ancas e trocanteres das pernas, labio e articulos basais dos palpos marrom avermelhados.

Pernas com estrias longitudinais nos femures, patelas, tibias e metatarsos, como nas fêmeas. Face dorsal do abdomen com mancha grande, ocupando mais de dois terços basais, formada de curtos pêlos sedosos.

Pêlos das pernas muito densos, principalmente nas patelas e tibias das pernas anteriores, mais longos do que o diametro dos articulos, formados de haste marrom avermelhada e terminando em pontas côr de cinza. Os mesmos pêlos se observam no abdomen, nas fiandeiras e nos palpos. No cefalotorax estes pêlos cinzentos são mais esparsos.

Estes pêlos faltam no esterno, nas ancas e nos trocanteres (no lado ventral), onde são substituidos por pêlos escuros, bem mais robustos e rigidos, ordenados em filas densas, em volta dos contornos do esterno e da parte anterior do labio.

Escópulas dos tarsos e metatarsos: — No 1° tarso não existem as escópulas veludosas, cerradas, mas em seu logar pelinhos muito delicados, finos, mas bastante longos, semieretos, não havendo, na linha mediana ventral, as cerdas "divisórias" das escópulas, mas apenas uma leve indicação destas, na área apical. Nos 3 tarsos das pernas seguintes as escópulas são do tipo comum, isto é, formadas por densos pelinhos curtos, sedosos e veludosos, havendo em seu meio densas fileiras longitudinais de "cerdas divisórias", cerdas estas a ocupar todo o comprimento do tarso e que se alargam apicalmente em forma de leque, chegando a dominar, perto do tufos subungueais, quase toda a largura ventral do articulo, de maneira que não há mais espaço aí para as escopulas. As cerdas divisórias do 2° tarso são irregulares na parte basal, mais numerosas e dirigidas para a frente nos dois terços apicais, a alargar-se, finalmente, em forma de leque.

No 3° tarso existem 4 a 6 filas de cerdas divisórias, mais ou menos regularmente dispostas, com o alargamento distal em forma de leque; no 4° tarso estas cerdas ocupam mais da metade ventral das

escopulas, na linha mediana e apicalmente se alargam sobre toda a largura do articulo (no lado basal, no terceiro e quarto tarso, as cerdas divisórias deixam livre uma área estreita, onde se aloja o espinho mediano apical do metatarso, quando o tarso se flexiona sobre este).

Nos metatarsos as escopulas são ausentes completamente no 4º par de pernas; no 3º par ocupam apenas uma pequena área apical, correspondendo talvez à quinta parte do articulo; no 1º e 2º par as escópulas são de todo invisiveis, principalmente no 1º par, enquanto que no 2.º ainda há uma insinuação delas.

Os *tufos subungueais* são muito pronunciados, constituidos por dois feixes cheios de pêlos aveludados, sedosos, brilhantes, um pouco mais longos do que as 2 garras. Estas são constituidas por uma base robusta e reta, fortemente quitinizada, preta, brilhante, que abrange dois terços do comprimento das garras, e a parte curva (um terço), final, com angulo curvo, em 80 graus com a haste. Existem sempre dois dentes apenas na margem interna da haste, sendo o apical o maior.

Espinhos: — Nos palpos não há nenhum espinho, como tambem no primeiro par de pernas, excetuados os das apófises tibiais.

Em todas as outras pernas só há espinhos nos metatarsos. No 2º metatarso 1 espinho ventral apical ou nenhum ou apenas com uma cerda mais robusta em logar do espinho. No 3º par 1 espinho ventral apical mediano (sobre o qual se flexiona o tarso), 2 espinhos laterais apicais (1 em cada lado do mediano apical), entre os quais se flexiona o tarso e 1 lateral anterior, quase apical. 4º metatarso com 9 a 11 espinhos ao total, sendo sempre constantes e de posição fixa o ventral mediano apical e os dois laterais apicais. Os outros ocupam sempre a metade apical, mas não obedecem a uma posição regular.

Quelíceras com 11,12 ou 13 denticulos, muito bem enfileirados, na margem inferior, sendo os do meio os maiores.

Cúspides em numero de 14 a 17, geralmente 15 na parte anterior do labio e 60 a 75 nos lobos maxilares dos palpos.

Olhos (vide fig. 3) formando 2 filas, sendo a primeira ligeiramente recurva ou quase reta e a segunda reta ou um tanto procurva. Ora os da primeira fila são iguais, ora os dois medianos são um tanto maiores do que os laterais anteriores. A distancia varia igualmente, sendo geralmente os laterais anteriores bem mais perto dos medianos anteriores do que estes ultimos entre si. Laterais anteriores e posteriores aproximadamente do mesmo tamanho, ora redondos ora um tanto obliquos Medianos pos-

teriores ora quase redondos, porem, geralmente, oblongos e colocados bem junto aos olhos laterais posteriores

Apófise tibial — (vide fig. 2). Existem sempre duas apófises. A ventral inferior é a maior, um tanto curva e armada de um espinho robusto no apice. A lateral é bastante pequena, terminando em ponta obtusa, sem espinho. Perto da base interna desta apófise há um espinho robusto, longo.

Orgão copulador — (vide fig. 1). Alvéolo do tarso bastante fundo, de maneira a possibilitar o alojamento do "pecciolo", da porção basal estreita do bulho e do primenro terço basal da porção mediana, vestibular do mesmo. Porção apical do bulbo ou êmbolo, do mesmo comprimento como a porção mediana, com transição lenta entre ambas, terminando o êmbolo numa ponta bem aguda. Torção em 180 graus.

CONCLUSÃO

1. *Magulla symmetrica* Bücherl, fêmea, representa realmente uma só espécie com o macho, ora descrito:

a) por terem ambos as mesmas relações de dimensões tanto no comprimento das pernas (o ultimo par é o mais longo, depois vem o primeiro par, em seguida o segundo e por ultimo o terceiro), como na relação dos comprimentos dos tarsos e metatarsos dos quatro pares de pernas e, finalmente, nas medidas entre o comprimento das patelas mais tibias do primeiro e do quarto par de pernas (patela e tibia I mais longa do que IV).

O fato de na femea o cefalotorax ser mais longo do que as patelas e tibias do 1º e do 4º par de pernas, respetivamente, e no macho as ultimas serem mais longas, representa o dimorfismo sexual (igual ao de outros gêneros de caranguejeiras).

b) Por apresentarem absolutamente o mesmo colorido;

c) Por se encontrarem com o mesmo habitat, aparecendo os representantes de um sexo em certo periodo do ano e os do outro sexo alguns meses depois (fato comum nas caranguejeiras).

No. de exemplares: — 3 machos, fichados na coleção aracnologica do Instituto Butantan.

Procedencia: — Ilha de São Sebastião, Estado de São Paulo, Brasil, perto da costa do oceano.

Data da captura: — 19 de abril de 1949.

Colecionadora: — Sra. Dona Helga Urban.

RESUMO

Magulla symmetrica, macho, é descrito como novo para a ciência e como sendo o primeiro macho de todas as espécies deste gênero.

ABSTRACT

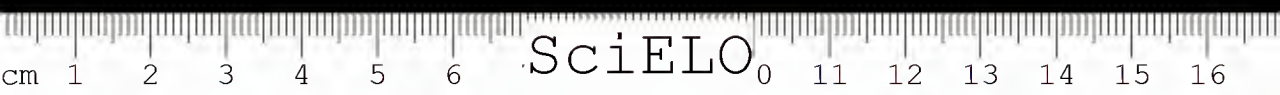
A few months ago was described the new species *Magulla symmetrica,* from São Sebastião, near the coast of the State São Paulo, Brazil, and the original description was based only over females. Now is described the male as new for science, from the same place and the description is made with 3 especimens.

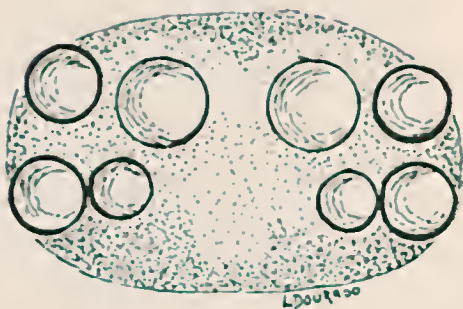
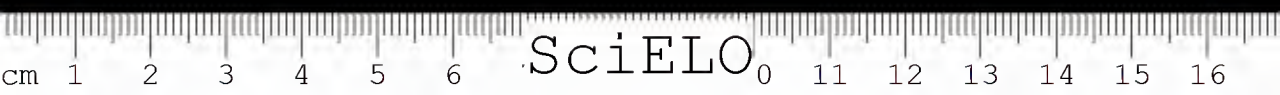
ZUSAMMENFASSUNG

Nachdem vor einigen Monaten *Magulla symmetrica* als eine neue Art beschrieben wurde, kann dieser Beschreibung nun auch die Charakterisierung des Maennchens beigefuegt werden.

Das Maennchen hat dieselbe Faerbung wie das Weibchen und zeigt auch die gleichen Verhaeltnisse de Masse sowohl der Laenge des Cephalothoraxes und der Patellen und Tibien des ersten und vierten Beinpaares, wie auch die gleichen Laengenverhaeltnisse der Beine (IV, I, II, III) und der Metatarsen und Tarsen.

A Dona Helga Urban os nossos agradecimentos pela coleta do material.

Agradecemos igualmente ao sr. Laureano Dourado pelos desenhos e prancha colorida.

Magulla symmetrica Bücherl ♂ —
Palpo com bulbo copulador.

Magulla symmetrica Bücherl.
Apófise tibial.

Magulla symmetrica Bücherl
Olhos.

Mem. Inst. Butantan,
22:1-10, Nov.º 1950.

Magulla symmetrica

DESCRIÇÃO DOS MACHOS DAS ESPÉCIES DE *TITYUS LUTZI* GILTAY 1928 E *TITYUS COSTATUS* (KARSCH, 1879) (GÊNERO *TITYUS* C. L. KOCH, 1836; SUBFAM. *ISOMETRINAE* BIRULA, 1917; FAM. *BUTHIDAE* SIMON, 1879)

POR WOLFGANG BÜCHERL & JOSÉ NAVAS

(Trabalho das Divisão de Zoologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Giltay, em 1928, em "Arachnides Nouveaux du Brésil", Ann. Bull. Soc. Ent. Belgique, *68*, descreveu a espécie *Tityus lutzi*, tendo como tipo uma fêmea capturada nos arredores de Cuiabá, Mato Grosso.

Tendo recebido nos últimos meses 3 escorpiões, enviados ao Instituto Butantan pelos fornecedores de animais venenosos, e tendo verificado que estes três exemplares, dos quais dois são machos, pertencem à espécie de Giltay, descrevemos, a seguir, o macho desta espécie, até agora desconhecido, referindo-nos igualmente à fêmea, que apresenta algumas particularidades morfológicas, não tomadas em consideração por aquele autor.

DESCRIÇÃO DO MACHO

Procedência: — Avaré, Estado de São Paulo; Presidente Epitácio (limites entre São Paulo e Mato Grosso).

Comprimento total — 56 mm; tronco — 22 mm; cauda — 34 mm.

Cefalotorax escuro, côr de couro, com u'a mancha triangular negra no prosoma desde o cômoro ocular até a borda anterior. Face dorsal de tronco com manchas escuras em fundo mais claro, apresentando o último tergito um triângulo mais escuro na linha mediana (vide prancha colorida 2). Cauda amarelo ocráceo, mais escura nos três últimos artículos e com as cristas dos segmentos

Entregue para publicação em 20 de junho de 1949.

IV e V pardo escuras. Tibia dos palpos com uma grande mancha pardo escura a ocupar quase toda a área e com dedos castanho-avermelhados.

Bordo anterior do cefalotorax quase reto, apenas ligeiramente bilobado e com ângulos laterais truncados. Cômoro ocular com largo sulco mediano, de aspecto liso, sendo os olhos separados entre si por um diâmetro e meio. Cristas superciliares levemente granulosas.

Face ventral (vide prancha 1) de um amarelo sujo, mais ou menos uniforme e apenas ligeiramente mais escura nos segmentos distais da cauda. Pernas dorsalmente manchadas de negro e ventralmente de amarelo uniforme.

Tegumento dorsal rugoso, com pontuações granulares irregulares. Tergitos I a VI densamente granulosos, com a crista mediana mais elevada na metade posterior das placas. Tergito VII com as cinco cristas granulosas habituais.

Esternitos I a IV com uma faixa transversal, ao longo da borda posterior, amarelo clara, sendo a do III esternito apresentada por um triângulo mediano posterior (vide prancha 1), liso e brilhante.

Pentes no macho de Avaré com 22 + 24 dentes, de lâmina intermediaria basilar não dilatada (no exemplar de Pres. Epitacio com 20 + 20 dentes).

Cauda bastante robusta, sendo o IV e V segmento um pouco mais largo do que os tres precedentes, o quinto duas vezes mais longo do que o primeiro.

Cristas medianas ventrais inferiores e laterais superiores granulosas, percorrendo toda a extensão dos segmentos I a IV (vide fig. 3). Cristas medianas dorsais granulosas, com os grânulos todos iguais, mesmo nos segmentos II a IV. Cristas laterais acessórias completas no segmento I e presentes só na metade posterior do segmento II.

Vesícula lisa e sem pêlos, com o espinho da base do ferrão pontiagudo e com dois grânulos dorsais.

Femur e tibia dos palpos com as cristas granulosas bem acentuadas. Cristas medianas da face anterior da tibia com o dente bacilar bem maior. Mão da largura da tibia ou apenas um nada mais larga, com 4 cristas dorsais distintas, sendo uma interrompida.

Dedo movel com lobo basilar bem desenvolvido. Relação entre o comprimento e largura da mão e do dedo movel: 5:3:7,5.

Macho de Avaré: — N° 26, vidro 79, da coleção do Instituto Butantan.
Macho de Presidente Epitácio: — N° 28, do vidro 81.

Comparação entre o exemplar de Giltay, de Cuiabá e o de Presidente Epitácio (n.º 29, vidro 81):

FÊMEA DE GILTAY	EXEMPLAR DE PRESIDENTE EPITÁCIO
42,5 mm; tronco: 17,5 mm; cauda 25 mm.	46,5 mm; tronco: 16,5 mm; cauda 30 mm.
Triângulo denegrido na prozona a começar do cômoro ocular.	Começa atrás do cômoro ocular, incluindo os olhos.
Último tergito de colorido uniforme.	Último tergito com 1 triângulo mediano anterior, escuro e com 2 manchas laterais escuras.
Palpo e pernas com manchas escuras.	Manchas escuras apenas dorsalmente, prevalecendo o colorido amarelo uniforme no lado ventral.
Mão amarelo-ocrácea.	Dorsalmente com pequenas manchas pardas.
Pentes com 21 dentes.	Pentes com 22 dentes de um e 23 do outro lado.

Descrição do macho de *Tityus costatus*

(vide prancha 4 e fig. 5)

Macho — 53 mm; cauda 19 mm; tronco 34 mm.

Cefalotorax marmorado de negro e testáceo. Tronco pardo-escuro com as bordas dos tergitos denegridas. Cauda com os dois primeiros segmentos amarelados; do terceiro ao quinto escurecendo progressivamente mais até ao negro fosco no V segmento. Vesicula vermelho escura, quase negra; ferrão na base avermelhado e na ponta denegrido. Patas fulvescentes, com manchas pardo escuras, leves. Palpos amarelo escuros, prevalecendo o tom escuro. A mão bem amarela; dedos denegridos, com as pontas um tanto avermelhadas. Esternitos, pernas e maxilares pardo amarelados. Pentes amarelo palidos (prancha 4).

Borda anterior do cefalotorax em ângulo muito obtuso, formando quase uma reta, granulosa. Cômoro ocular com sulco finamente granuloso. Cristas superciliares curvas bem salientes e irregularmente granulosas. Parte posterior do cefalotorax com duas cristas curtas, subparalelas, levemente divergentes atrás.

Tergitos densamente granulosos, com granulações mais grosseiras, formando arcos transversais, nos tergitos III a VI. Crista mediana acentuando-se progressivamente nos tergitos posteriores, mas presente já do I ao ultimo tergito, mais fraca nos tres primeiros e bem visivel no III ao VII segmento. Neste a crista mediana ocupa quase dois terços anteriores; cristas laterais levemente curvas para fóra, quase completas e divergentes.

Esternitos com granulação muito fina; I e II com borda posterior larga, amarela, III com borda posterior em forma de triangulo mediano, liso, amarelo. Esternito IV com duas cristas paralelas, V com 4 cristas paralelas, granulosas,

atingindo as duas medianas as bordas posteriores, enquanto que as laterais só se estendem sobre os dois terços anteriores da placa.

Pentes com 17 dentes em cada lado; a lamina basilar intermediaria não dilatada.

Cauda robusta, paralela, finamente granulosa. V segmento duas vezes mais longo do que o primeiro. Do segundo segmento para trás cada segmento seguinte sempre um pouco mais longo do que o precedente. Cristas medianas ventrais, laterais inferiores, laterais superiores e medianas dorsais completas, granulosas, presentes nos segmentos I a IV, mas menos pronunciadas já no quarto. Cristas medianas dorsais convexas, sem dente posterior maior nos segmentos II e III. Cristas laterais acessórias presentes e completas nos segmentos I e II, ausentes nos outros segmentos. Segmento V com 5 cristas, muito mal visiveis.

Vesícula quase lisa, com uma crista ventral mediana leve, a terminar no espinho sob o ferrão. Este espinho agudo e com 2 granulos dorsais.

Palpos finamente granulosos, com as cristas não muito acentuadas; crista mediana anterior da tibia fracamente serrilhada. Mão quase tres vezes mais larga do que a tibia (caracter sexual do macho) e quase duas vezes mais larga do que a mão do mesmo comprimento da fêmea. Dedos um nada mais longos do que a mão. Dedo movel com forte lobo basilar e um igual, mas um pouco mais fraco no imovel, de maneira que, fechando-se os dois dedos, medeia um espaço na base dos dois (dimorfismo sexual entre os dois sexos). Dedo movel com 13 filas de granulos no gume (fig. 5). Relação entre o comprimento e a largura da mão e o comprimento do dedo movel: — 5:3.5 e 7 mm.

Localidade: — Ilha de São Sebastião.

Remetente: — Dona Helga Urban.

Na coleção escorpiônica do Instituto Butantan: — No. 499, frasco 245.

DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE A FÊMEA E O MACHO

FÊMEA	MACHO
Sem lobo basilar entre os dedos da mão.	Forte lobo basilar entre os dois dedos da mão.
Mão não muito mais larga do que a porção basal dos dedos juntos.	Mão do dobro da largura da porção basal dos dedos juntos.
Colorido da mão pardo escuro.	Mão amarela.

RESUMO

São descritos como novos para a ciencia os machos das espécies *Tityus lutzi* e *costatus*. Ambos apresentam os mesmos caracteres morfologicos espe-

cificos das respetivas fêmeas, já conhecidas, de maneira que não persiste duvida de que estes machos realmente pertencem às fêmeas das aludidas espécies.

Ao mesmo tempo foram constatadas diferenças sexuais nos dois sexos em ambas as espécies. Em *Tityus lutzi* o macho apresenta um lobo basilar na base interna dos dedos da mão e os dois ultimos articulos da cauda são bem mais grossos, enquanto que os mesmos, na fêmea, têm a mesma espessura em todo o percurso da cauda, afilando-se esta atrás.

O macho de *Tityus costatus* apresenta igualmente um forte lobo basilar na mão; a propria mão do macho é muito espessa, atingindo duas vezes a espessura da mão da fêmea. A cauda, entretanto, é igual em ambos os sexos. Há ainda uma diferença no colorido entre os dois sexos, especialmente na mão, que no macho se apresenta amarela e na fêmea pardo escura.

No lote de fêmeas de *Tityus lutzi*, existentes na coleção escorpiônica do Instituto Butantan, foram confrontadas igualmente fêmeas provenientes de Presidente Epitácio (Estado de São Paulo, Brasil) com a fêmea-tipo, descrita por Giltay e proveniente de Cuiabá (Mato Grosso, Brasil), encontrando-se ligeiras variações no colorido, principalmente do último tergito e no numero de dentes nos pentes, que são de 21 no exemplar de Giltay e 22 a 23 no lote de Presidente Epitacio.

Pelo confronto de mais exemplares de *Tityus lutzi* pudemos inferir da variação no numero de dentes nos pentes: no exemplar descrito por Giltay há apenas 21 dentes; nas fêmeas de Presidente Epitacio verificamos 22 a 23 dentes; no macho da mesma localidade apenas 20 dentes e num macho, procedente de Avaré, 22 e 24 dentes em cada lado.

ZUSAMMENFASSUNG

Von den zwei brasilianischen Skorpionarten, *Tityus lutzi* Giltay und *Tityus costatus* (Karsch) werden die beiden Maennchen beschrieben, die bisher unbekannt waren.

Zugleich werden fuer die beiden Maennchen die sekundaeren Geschlechtsmerekmale, die sich durch basale Verdickungen an der Basis der Innenseiten der Handfinger bemerkbar machen, dargelegt. *Tityus lutzi*, Maennchen, hat auch noch die beiden vorletzten Caudalsegmente verdickt, waehrend der ganze Schwanz des Weibchens paralell verlaeuft.

Bei dem Maennchen von *Tityus costatus* ist der Schwanz nicht verdickt, sondern paralell wie beim Weibchen; jedoch hat die Hand des Maennchens

dieser Art sehr bedeutende Basalverdickungen an den Fingern, die beim Weibchen fehlen und die Hand des Maennchens selber ist mindestens zweimal so dick wie beim Weibchen, bei der gleichen Groesse der Haende; schliesslich zeigt die Hand des Maennchens eine lebhafte gelbe Faerbung waehrend diese beim Weibchen dunkelgrau bis schwaerzlich ist.

Bei einer Vergleichung der Zahl der Kammzaehne sowohl der Maennchen wie der Weibchen von *Tityus lutzi* konnte festgestellt werden, dass dieser Charakter sehr variiert, von 21 Zaehnen des Weibchens von Giltay (aus Cuiabá, Mato Grosso, Brasilien), 22 und 23 Zaehnen der Weibchen von Presidente Epitacio (Staat São Paulo), 20 Zaehnen bei einem Maennchen aus dem gleichen Orte und schliesslich 22 bis 24 Zaehnen von Maennchen aus Avaré (Staat São Paulo).

Ueber den Verbreitungsort der Art, *Tityus costatus*, die urspruenglich nur von der Serra dos Orgãos, im Staate von Rio de Janeiro, also einem bis 1.000 Meter Hoehe erreichendem Gebirgszuge, bekannt war, kann hinzugefuegt werden, dass die Skorpionsammlung des Institutes Butantan auch ueber Exemplare verfuegt, die aus Hoehen von 700 bis 1.000 Metern stammen, und zwar aus Gebieten, die mehrere 100 bis 1.000 Kilometer von dem ersten Fundorte entfernt liegen, wie Fundplaetze im Staate von São Paulo, von Paraná, von Minas Gerais. Das in vorliegender Arbeit beschriebene Maennchen stammt von der Insel São Sebastião, eine relativ grosse, im Atlantischen Ozean liegende Insel, die der Kueste des Staates São Paulo sehr eng anliegt und sich ebenfalls durch grosse Hoehenlagen auszeichnet, und deren weitere Arthropodenfauna der der Serra dos Orgãos ziemlich gleichkommt.

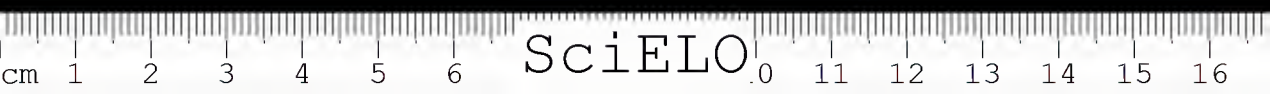
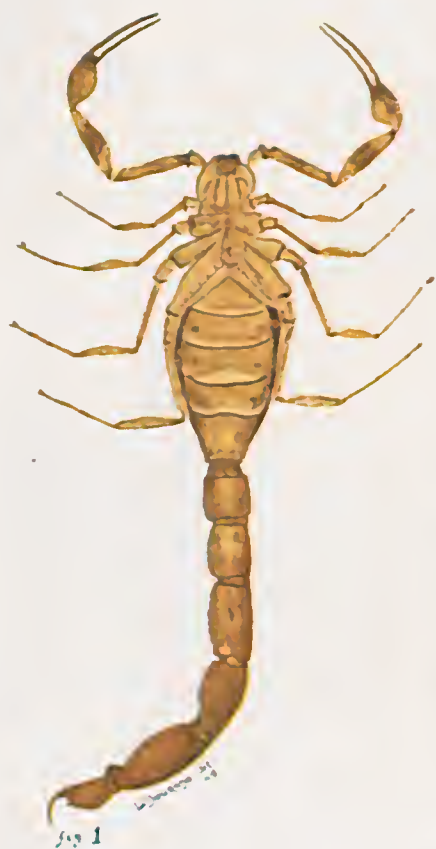
ABSTRACT

The males of *Tityus lutzi* Giltay, 1928, and *Tityus costatus* (Karsch, 1879), are described as new for science. The original description of the female from Giltay, recollected near from Cuiabá (Mato Grosso) is confronted with the males and females of the collection from Instituto Butantan and color variations are demonstrated as well as the frequent mutation of the number of "teeth" on the combs: the female from Cuiabá has 21 teeth, the from Presidente Epitacio (between the States São Paulo and Mato Grosso) 22-23; the male of the same locality 20 in both sides and another male, from Avaré (State São Paulo) has 22 and 24 teeth. The secondary sexual characters in *Tityus lutzi* are expressed by basal lobes of the fixed and movable finger of the hands in males and of

the larger size of the proper hand of the larger three last caudal segments. Females has not basal lobes at the basis of fingers; their hands are relatively small and their caudal segments are small.

The male of *Tityus costatus* has a very large hand; the basal lobes of the fingers are very good expressed, but the caudal segments are the same as in the female. The color of hand of the male is yellowish and of the female is grayish dark.

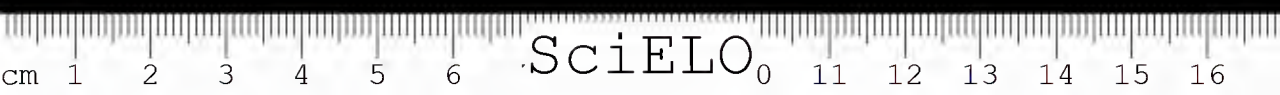
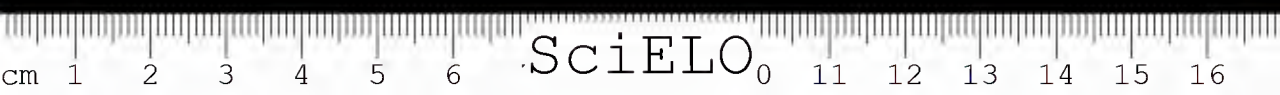
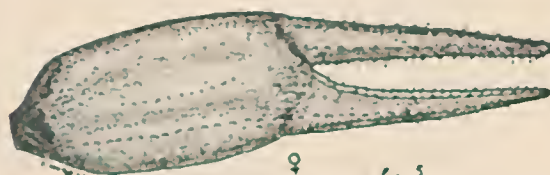
Agradecemos ao sr. Laureano Dourado, os desenhos e as pranchas coloridas que acompanham este trabalho.

Somos gratos igualmente à sra. Helga Urban pelo interesse que tem tomado na colheita do material da Ilha de São Sebastião.

Mem. Inst. Butantan,
22:1-10, Nov.º 1950.

Tityus Lutzi — ♂ — *N.º 26*

Mem. Inst. Butantan,
22:1-10, Nov.° 1950.

Tityus costatus ♂

Mem. Inst. Butantan,
XX-11-24, Nov. 1950.

Tuyus costatus.

MECANISMO DE ACÇÃO ANTICOAGULANTE DO *LATEX* DE *FICUS GLABRATA* H.B.K.

POR MURILO P. AZEVEDO
(Do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

É bem conhecida dos nativos da América Central, a acção vermicida do látex de certas espécies de figueiras, por êles denominado "Leche de higueron".

No Brasil, Peckolt (1) realizou estudo químico do látex oriundo das espécies *Ficus silvestris* St. Hilaire e *Ficus doliaria* Mart., obtendo desta última, uma substância cristalina, provavelmente um glicosídio, que denominou "doliarina". Do mesmo látex obteve uma pepsina vegetal a qual deu o nome de "urostigma papaiotin".

Bouchut (2) trabalhando com o látex de *Ficus carica* L. encontrou um fermento digestivo cuja acção se faz sentir principalmente sôbre a fibrina.

Desde então foram as pesquisas orientadas no sentido do aproveitamento do látex dessas plantas na terapêutica das parasitoses intestinais.

Uma completa revisão histórica do assunto foi feita por Ansejo (3) ao estudar a atividade proteolitica do látex do *Ficus pumila* L.

Os trabalhos mais recentes, de Robbins (4,5) e Robbins e Lamson (6) estabelecem as condições em que melhor se processa a actividade proteolítica dêsses fermentos.

Estudando o látex do *Ficus laurifolia*, verificou Robbins (4) que o princípio ativo é uma substância de natureza proteica existente na proporção de 25% em pêso do látex, precipitável pelo cloreto de mercúrio, sulfato de magnésio, acetona e alcool. Por precipitações e redissoluções sucessivas, conseguiu o princípio ativo sob forma de um pó amarelado, ao qual deu o nome de "Ficina". Mostrou que êsse fermento assemelha-se à tripsina, já que o ótimo de concentração hidrogeniónica para sua actuação, está entre 4 e 8,5 sendo sua atividade enzimática destruída em pH abaixo de 4. Sugere também o autor a presença, na ficina, de dois princípios activos, um cuja acção seria matar o tecido vivo e outro digerí-lo. Para os estudos de proteólise usou a gelatina como substrato, verificando que em tal caso o pH ótimo de actuação é 5.

Entregue para publicação em 27 de junho de 1949.

As primeiras observações relativas à atividade anticoagulante dêsse fermento sôbre o sangue, foram realizadas entre nós por Cançado (**) (7) que, colocando látex de *Ficus glabrata* H.B.K. sôbre sangue total recentemente colhido determinava a sua incoagulabilidade.

Sugeriu que tal fenômeno fosse decorrente da acção litica da enzima sôbre o fibrinogênio ou sôbre a protrombina.

A favor desta última hipótese diz o autor: "O sangue humano normal contém cêrca de 0,38g. de fibrinogênio por 100 cm³ e esta mesma quantidade de sangue fornece 0,02g. de protrombase"...

"Assim pois, se a protrombase e o fibrinogênio podem servir de substrato para a enzima do látex, é natural supôr-se que a digestação da protrombina seja feita mais ràpidamente, isto é, dentro de 4 a 8 minutos que constituem o tempo de coagulação normal".

"A ficina actuaria portanto como uma antiprotrombase, mas no sentido de eliminar a protrombase e não apenas impedindo a sua transformação em trombase como faz a heparina segundo alguns".

Procurando esclarecer o mecanismo de acção dêsse fermento, estudamos as modificações que se processam para o lado do fibrinogênio e da protrombina, quando se faz actuar o látex sôbre plasma humano.

MATERIAL E MÉTODO

Fizemos actuar quantidades variáveis de látex sôbre volumes constantes de plasma humano oxalatado, verificando num segundo tempo quais as amostras de plasma que coagulavam pela adição de tromboplastina e cálcio.

Pudemos assim estabelecer uma dose minima anticoagulante de látex. Tomamos então amostras de plasma submetidas a essa dose, e diluímos a 50% em plasma desprotrombinizado (*) restaurando assim o fibrinogênio por ventura destruído sem interferir sôbre a protrombina. A determinação do tempo de coagulação pela adição de tromboplastina e cálcio dêste plasma assim diluído, mede o seu teor em protrombina, único elemento variável neste sistema coagulante.

No quadro No. 1 temos detalhado o protocolo de uma dessas experiências.

Apresenta uma bateria de 9 tubos de ensaio com 0,5 ml de plasma humano oxalatado. Ao primeiro tubo (testemunha) foi adicionado 0,1 ml de solução salina a 0,85% e aos demais, 0,1 ml de diluições crescentes de látex em solução

---

(*) Plasma humano oxalatado adicionado de 20 % de sulfato de bário em suspensão a 30 %, deixado à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugado, recolhendo-se o sobrenadante. O sulfato de bário adsorve a protrombina sem intervir sôbre o fibrinogênio.

(**) O latex de *Ficus glabrata* H. B. K. empregado nestas esperiências nos foi gentilmente fornecido pelo Dr. J. Romeu Cançado, a quem deixamos consignados os nossos agradecimentos.

QUADRO I

Tubo No.	Látex Diluição	Látex Volume	Látex Quantidade equivalente	Solução salina	Plasma		Plasma	Trombo-plastina	$CaCl^2$ 0,028M	T. C.
1	—	—	—	0,1 ml	0,5 ml	30' a 37° C	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	12"
2	1:5	0,1 ml	0,02000000g	—	0,5 ml		0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	∞
3	1:10	0,1 ml	0,01000000g	—	0,5 ml		0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	∞
4	1:20	0,1 ml	0,00500000g	—	0,5 ml		0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	∞
5	1:40	0,1 ml	0,00250000g	—	0,5 ml		0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	∞
6	1:80	0,1 ml	0,00125000g	—	0,5 ml		0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	∞
7	1:160	0,1 ml	0,00062500g	—	0,5 ml		0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	12"
8	1:320	0,1 ml	0,00031250g	—	0,5 ml		0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	12"
9	1:640	0,1 ml	0,00015625g	—	0,5 ml		0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	13"

∞ = incoagulabilidade após 900" de observação.

QUADRO II

No.	Látex	Solução salina	Plasma		Plasma	Plasma Desprotrombinizado	Trombo-plastina	$CaCl^2$ 0,028 m	T. C.
1	—	0,1 ml	0,5 ml	30' a 37° C	0,05 ml	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml	16"
2	0,00125 g	—	0,5 ml		0,05 ml	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml	17"
3	0,000625g	—	0,5 ml		0,05 ml	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml	16"

salina a 0,85% (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640). Após 30' em banho Maria a 37°C, determinamos o tempo de coagulação (T.C.) de cada uma das amostras de plasma dos vários tubos, pela adição de cálcio e tromboplastina, procedendo de acordo com a técnica de Quick (8) para determinação do tempo de protrombina.

Para tanto tomamos 0,1 ml da amostra de plasma em tubo 12x12 e adicionamos 0,1 ml da suspensão de tromboplastina e 0,1 ml de solução de $CaCl^2$ a 0,028M, cronometrando a partir da adição do cálcio. Durante tôda a experiência os tubos foram mantidos à temperatura de 37°C. Considerou-se como ponto final da reação, o início do aparecimento de uma rede de fibrina que aos poucos aumenta até a formação de um bloco gelatinoso. A observação foi feita diante de um foco luminoso e sob fundo escuro.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os plasmas dos tubos No. 1 (testemunha sem látex), 7, 8 e 9 coagularam em tempos sensìvelmente iguais (12" a 13"), após adição de tromboplastina e cálcio. Nas amostras dos tubos 2 a 6, a coagulação não se verificou, sendo portanto a diluição de 1:80, ou melhor a dose de 0,00125 g de látex para 0,5 ml de plasma, a mínima anticoagulante.

Tomamos então amostras de plasma que tivessem sido adicionadas da dose mínima anticoagulante de látex e investigamos as causas da incoagulabilidade.

Para tanto colocamos em 3 tubos de ensaio (1, 2 e 3) 0,5 ml de plasma em cada um. (Quadro No. 2). Ao primeiro juntamos 0,1 ml de solução salina a 0,85%, ao segundo 0,1 da diluição 1:80 de látex (0,000125 g) e ao terceiro 0,1 ml de diluição 1:160 (0,000625 g.).

O primeiro tubo, sem látex, serviu como testemunha. O segundo tubo continha a dose mínima anticoagulante, e o terceiro a metade dessa dose. Esses tubos eram pois exatamente iguais respectivamente aos de No. 1, 6 e 7 da experiência anterior.

Após 30' a 37° determinamos o T.C. de cada um deles, diluídos a 50% em plasma desprotrombinizado. A técnica de determinação do T.C. foi exatamente a mesma da experiência anterior.

Verificamos (quadro No. 2) que as amostras dos três tubos coagularam em tempos iguais ou muito próximos (16" a 17").

A amostra do tubo 2, exatamente igual à do tubo 6 que na experiência anterior era incoagulável, passou a coagular em tempo igual ao plasma testemunha, sem látex (tubo 1) pela adição de plasma desprotrombinizado, ou melhor, quando se juntou ao sistema, o substrato do coágulo, o fibrinogênio.

Êste era portanto o elemento em falta para que se processasse a coagulação. A protrombina não se alterou; estava presente, tanto assim que restaurando-se o fibrinogênio e adicionando-se tromboplastina e cálcio ao sistema, a coagulação se verificou.

Assim sendo, a adição de látex determina lise do fibrinogênio, sem comprometimento da protrombina, pois que, juntando-se tromboplastina e cálcio ela se activa em trombina, coagulando o fibrinogênio restaurado pela adição de plasma desprotrombinizado.

A demonstração de que o látex determina lise do fibrinogênio, ou pelo menos, a perda de sua coagulabilidade, pode também ser verificada pelo fato de que, o plasma adicionado de látex não se coagula pela adição de trombina ou de veneno de *Bothrops jararaca*, elementos que actuam diretamente sobre o fibrinogênio, insolubilizando-o em fibrina.

A actividade lítica do látex se estende à fibrina.

Colocando-se um coágulo de fibrina numa suspensão de látex, tem-se lise em tempo maior ou menor, de acôrdo com o seu tamanho e com a concentração do fermento.

O látex de *Ficus glabrata* H.B.K. possui assim um fermento proteolítico que, atuando sobre o sangue, torna-o incoagulável pelas modificações que promove sobre o fibrinogênio, quer lisando-o, quer alterando a sua coagulabilidade, de modo a impedir a sua transformação em fibrina.

RESUMO E CONCLUSÕES

O A. estuda o mecanismo de acção anticoagulante do látex de *Ficus glabrata* H.B.K. sobre o sangue humano, verificando que o fermento proteolítico nele contido actúa sobre o fibrinogênio sem interferir sobre a protrombina.

Demonstra que sua acção é fibrinogenolítica.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The author studies the mechanism of the anti-coagulant action of the latex from *Ficus glabrata* H. B. K. on human blood, verifying that its proteolytic ferment acts upon the fibrinogen without interfering with prothrombin. He demonstrates that its action is fibrinogenolytic and fibrinolytic.

SOMMAIRE ET CONCLUSIONS

L'Auteur étudie le mécanisme de l'action anti-coagulant dum látex de *Ficus glabrata* H.B.K. sur le sang humain, en concluant que le ferment protéolytique qu'il contient agit sur le fibrinogène sans intervenir avec la prothrombine.

Il démontre ensuite que cette action est fibrinogènolytique e fibrinolytique.

BIBLIOGRAFIA

1. *Peckolt, T.* — Arch. der Pharmazie **155** : 31, 1861 citado por *Ansejo, C. F.* — Puerto Rico J. Publ. Health. Trop. Med. **15**: 141, 1940.
2. *Bouchut, E.* — Citado por *Ansejo, C. F.* ibidem.
3. *Ansejo, C. F.* — Puerto Rico J. Publ. Health. Trop. Med. **15**: 141, 1940.
4. *Robbins, B. H.* — J. Biol. Chem. **87**: 251, 1930.
5. *Robbins, B. H.* — Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **32**: 892 *et* 894, 1935.
6. *Robbins. B. H., Lamson, P. D.* — J. Biol. Chem. **106**: 725, 1934.
7. *Cançado, J. R.* — Rev. Brasileira de Biologia **4**: 349, 1944.
8. *Quick, A. J.* — The Hemorrhagic Diseases and the Physiology of Hemostasis. C. C. Thomas. 1942.

ACÇÃO PROTEOLITICA DO VENENO DA *BOTHROPS JARARACA* (WIED)

I. *Acção sôbre hemoglobina e caseina*

POR MURILO P. AZEVEDO & I. MARTIRANI
(Dos Laboratórios de Imunologia e de Contrôle do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

As primeiras observações relativas à actividade proteolitica dos venenos de serpentes, parecem pertencer à Fontana (1) que, em 1767 escreveu em sua tese: "... as rãs e outros animais feridos pelo veneno de vibora, mostram suas carnes amolecidas que se fragmentam e se destacam dos ossos" e mais adiante "... este suco é talvez necessário à digestão". Posteriormente, os trabalhos de Emery (2), Leydig (2a), Rudolphi (2b) e Lacerda (3), vieram demonstrar que realmente tais venenos eram dotados de actividade proteolitica. Wahrman (4), tomando a fibrina como substrato, verificou que, embora não se observasse modificação em seu aspecto, o liquido sobrenadante dava reação de "biuret" positiva, concluindo que havia, embora em pequeno grau, uma acção peptonizante do veneno sôbre a fibrina. Launoy (5), empregando o método de Beckman para medir a quantidade de azoto insolubilizado pelo formol, verificou a solubilização parcial das proteinas contidas em soluções de caseina e em sôro bovino, por acção dos venenos de *T. natrix*, *V. aspis* e *Naja*. Estudando comparativamente a actividade proteolitica de vários venenos de serpentes sôbre a gelatina e fibrina, Noc (6) poude concluir que todos êles possuem acção proteolitica sôbre substâncias albuminóides não coaguladas pelo calor, actividade que explicaria a incoagulabilidade do sangue de animais inoculados com veneno. Vital Brazil e Rangel Pestana (7), empregando a técnica de Noc (6), classificaram uma série de venenos, segundo a sua actividade proteolitica, verificando que a proteólise do sangue se processa na mesma ordem de atividade que a proteólise da gelatina. Houssay e Negrete (8) estudaram uma série de venenos, mostrando que esse poder proteolitico é grande, ao contrário do que afirmara Launoy (5), o que puderam verificar pelo aumento de substância proteica não coagulável do subs-

Recebido para publicação em 27 de junho de 1949.

trato, aumento dos ácidos aminados e do tempo de coagulação térmica. Mostraram que tais venenos transformam a caseina tornando-a não precipitável pelo ácido tricloroacético e modificam a gelatina, liquefazendo-a e determinando a formação de ácidos aminados. Concluiram afirmando que as propriedades proteolítica, coagulante, aglutinante, tóxica e hemolítica dos venenos de serpentes, diferem umas das outras, pois variam diversamente de acôrdo com a amostra de veneno, não são neutralizadas do mesmo modo pelos soros específicos e a destruição pelo calor não se faz de forma igual para todas elas. Taborda e Taborda (9), estudaram a hidrólise do caseinato de cálcio pelo veneno da *Bothrops jararaca* e a influência de vários fatores que interferem sôbre o fenômeno.

Não obstante o número de trabalhos até hoje publicados sôbre o assunto, os nossos conhecimentos a respeito são ainda limitados, razão porque diz Zeller (10) haver necessidade de se acumularem dados quantitativos, comparando-se os resultados obtidos com as actividades biológicas correspondentes dos venenos.

Em vista da importância crescente que o problema vem dia a dia assumindo devido á difusão do emprego dos venenos em terapêutica, resolvemos estudá-lo, procurando determinar os diferentes fatores que interferem com o fenômeno da proteólise, baseando-nos na formação de tirosina por acção do veneno sôbre substratos de hemoglobina e caseina.

MATERIAL E MÉTODOS

Veneno: — *Bothrops jararaca* centrifugado e liofilizado imediatamente após a colheita. Eliminam-se assim as impurezas insolúveis. O veneno assim tratado torna-se mais solúvel e suas actividades proteolítica e tóxica aumentam comparativamente ao obtido pelo processo comum de secagem em estufa.

Hemoglobina — O substrato de hemoglobina foi preparado do sangue de cavalos normais, de acôrdo com a técnica descrita por Anson (11).

Caseina: — Solução a 2% de caseina Hammarsten tamponada com veronal e tindalizada.

O método de estudo por nós empregado baseou-se no doseamento da tirosina formada pela proteólise que o veneno determina sôbre os substratos de caseina e hemoglobina.

Para tanto, colocamos diferentes diluições de veneno em salina a 0,85% sôbre substratos de caseina e hemoglobina em diferentes pH e temperaturas, retirando-se em espaços de tempos diversos, "aliquots" de 2,5 ml que foram precipitados pelo ácido tricloroacético (5 ml de sol. 0,3 N). Após filtração,

tomamos 2,5 ml do filtrado, juntamos 5 ml de soda 0,5 N, 1,5 ml do reativo do Folin e Ciocalteau (12) e após 5 minutos para o máximo desenvolvimento de côr, fizemos a leitura no aparelho de Fischer, modelo A. C. filtro No. 650 (vermelho). Tomamos como "Blank" a mistura dos mesmos elementos que entraram na composição de cada "aliquot", precipitados imediatamente pelo ácido tricloroacético. Assim pois afastamos as causas de erro decorrentes da presença, nos "aliquots", de substâncias cromogénicas que não a tirosina, bem como da própria tirosina oriunda de possível autohidrólise do substrato.

RESULTADOS

Procuramos inicialmente determinar a curva padrão para o aparelho com que íamos trabalhar.

Para tanto, colocamos em 6 tubos respectivamente: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 ml de solução padrão de tirosina (*) completando os volumes a 5 ml com HCl a 0,2 N.

Juntamos a todos êles 10 ml de NaOH 0,5 N e 3 ml do reactivo de Folin e Ciocalteau (**).

Após 5 minutos para o máximo desenvolvimento de côr, procedemos á leitura.

Os resultados foram os seguintes (Quadro I):

QUADRO I

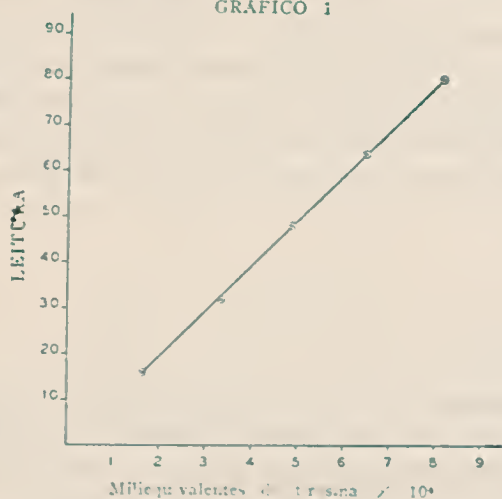
Tubo No.	Vol. da sol. de tirosina	HCl 0,2 N	Miliequivalentes de tirosina	Leitura
2	1,0	4,0	0,00016	16,5
3	2,0	3,0	0,00032	33,5
4	3,0	2,0	0,00048	48,5
5	4,0	1,0	0,00064	65,0
6	5,0	0,0	0,00080	81,2

Estes dados colocados em gráfico (Gráfico No. 1) formam uma linha reta, o que vem demonstrar o grau de sensibilidade do aparelho e a precisão do método. Por outro lado, fica também demonstrado que a intensidade de côr desenvolvida é

(*) A solução de tirosina foi feita em HCl 0,2 N contendo 0,0008 miliequivalentes, por 5 ml, ou seja 0,0112 mg de azoto da tirosina dosado pelo micro-Kjeldahl.

(**) Empregamos sempre o reactivo de Folin e Ciocalteau diluido no momento de ser usado, ao dobro de seu volume com água distilada.

diretamente proporcional à quantidade de tirosina presente na solução, havendo mesmo entre estes 2 valores, uma proporção linear.

GRAFICO 1

Concentração de veneno: — Estudamos inicialmente as variações de grau de proteólise em função da concentração do veneno, mantendo fixos o pH e a temperatura de experiência.

Adicionamos ao substrato de hemoglobina, 100γ, 200γ, 300γ, 400γ, e 500γ, de veneno por ml de substrato, sendo o veneno diluido em sol. salina a 0,85%.

Após 30 minutos em estufa a 34°C procedemos ao doseamento da tirosina de acôrdo com a técnica anteriormente descrita.

GRAFICO 2

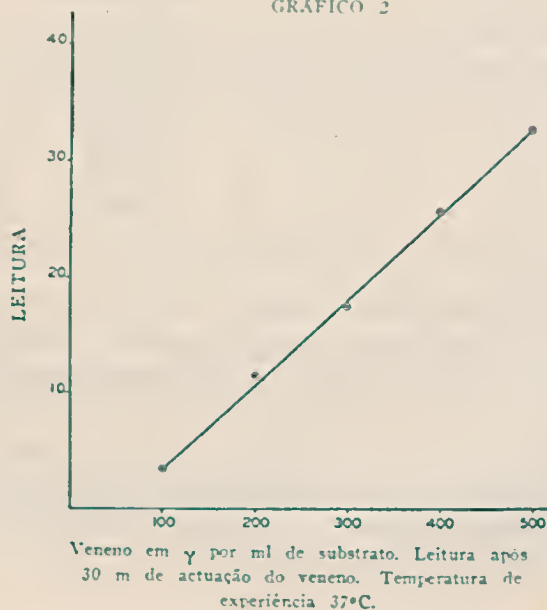
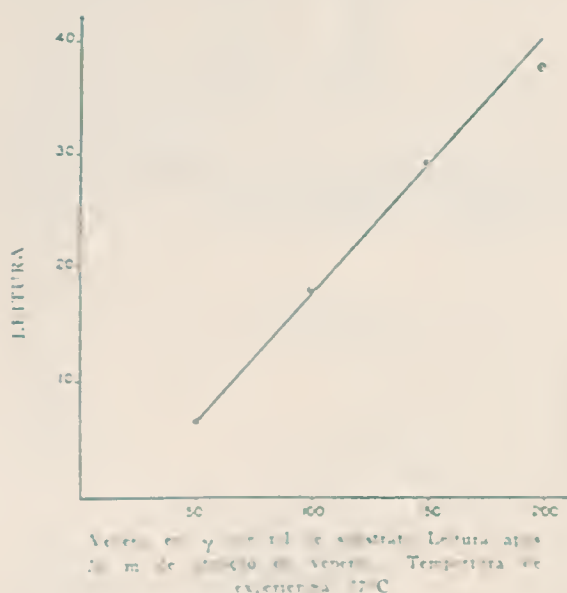
Veneno em γ por ml de substrato. Leitura após 30 m de actuação do veneno. Temperatura de experiência 37°C.

O Gráfico No. 2 apresenta os resultados de uma dessas experiências. Vemos por êle que os valores das leituras se dispõem numa linha recta, mostrando a relação linear existente entre concentração de veneno e grau de proteólise.

GRAFICO 3

Veneno em γ [illegible] Leitura após [illegible] Temperatura de experiência [illegible] C

Com o substrato de caseína o mesmo fato se verifica (Gráfico No. 3).

Sendo entretanto a caseína, uma molécula mais simples que a hemoglobina, a sua cisão é mais fácil é assim com a mesma quantidade de veneno se obtem uma proteólise maior.

Por este motivo trabalhamos com quantidades menores de veneno: de 50γ a 200γ por ml de substrato.

Tempo de atuação: — A intensidade de proteólise é também proporcional ao tempo em que o veneno atúa sôbre o substrato.

Retirando-se "aliquots" para doseamento em tempos diversos, obtivemos os seguintes resultados em substrato de hemoglobina (Quadro N.o II):

QUADRO II

Concentração de veneno em γ por ml de substrato	L e i t u r a				
	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
100	3,5	7,0	7,5	8,5	13,5
200	11,5	15,0	16,5	20,0	27,0
300	17,5	22,0	26,0	30,0	35,0
400	25,0	32,0	38,0	42,0	51,5
500	32,5	36,5	45,0	53,0	66,0

Em qualquer das concentrações de veneno estudadas, o grau de proteólise aumentou em função do tempo (Gráfico No. 4).

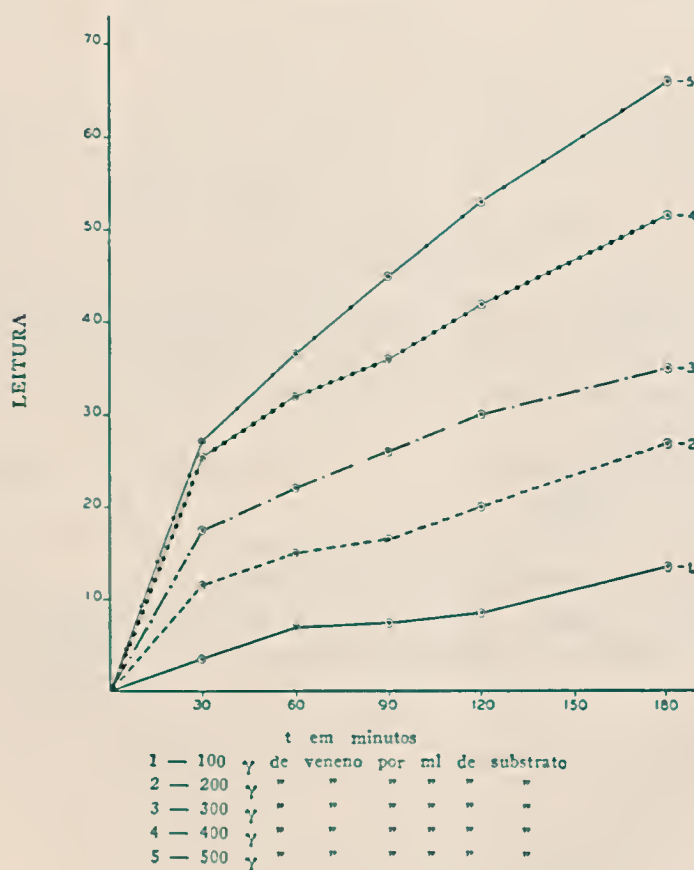
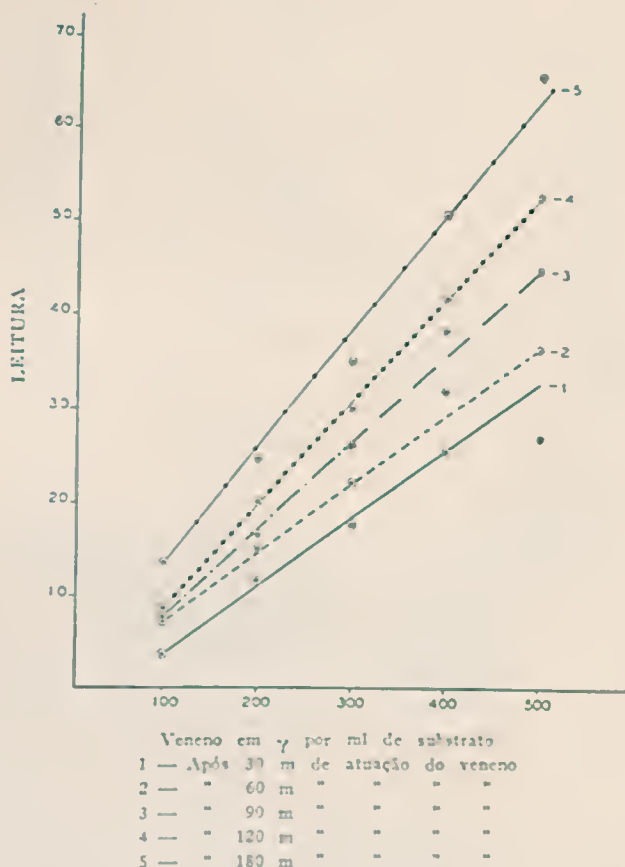
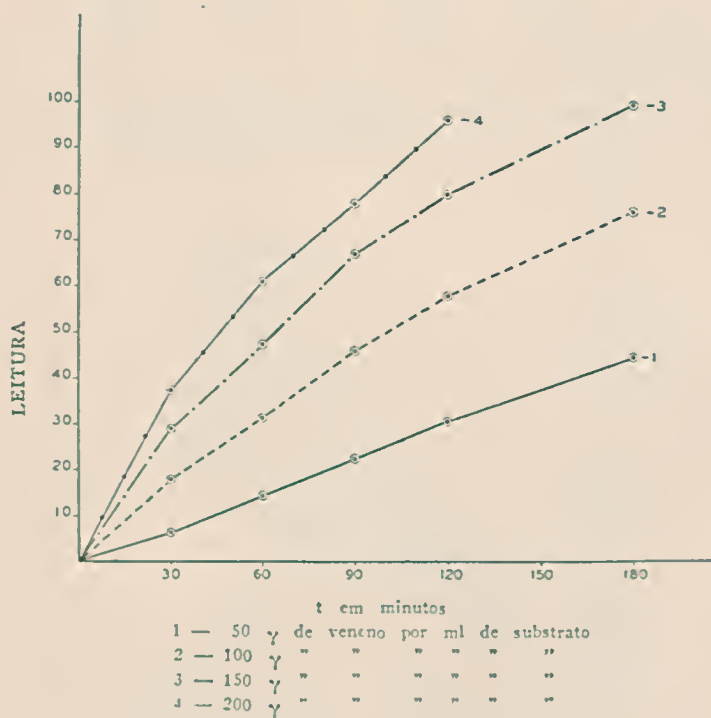
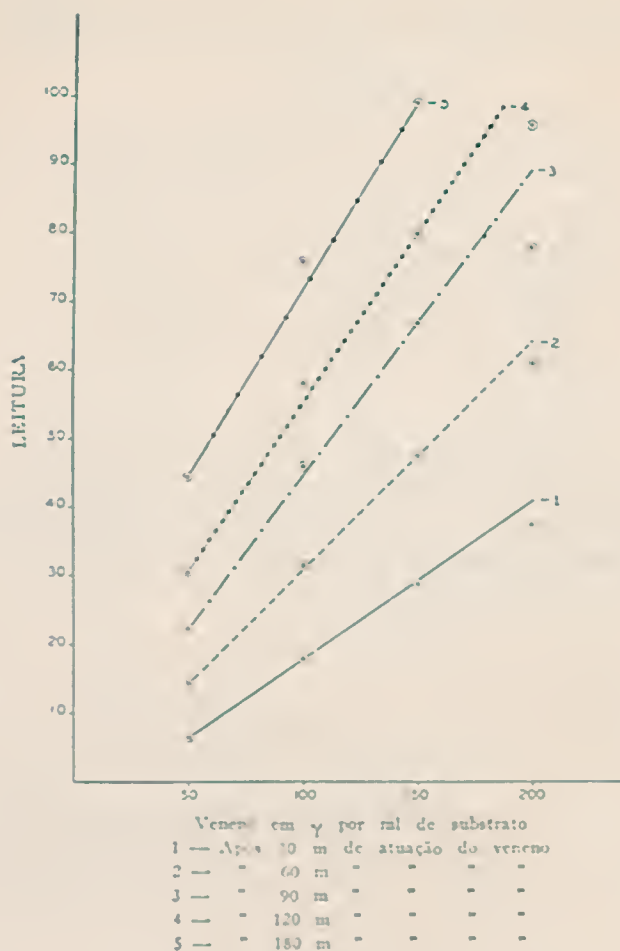
GRAFICO 4

Colocando-se em abcissas as concentrações de veneno e em ordenadas as leituras, vamos obter curvas que exprimem os vários graus de proteólise que as diferentes concentrações de veneno determinam num tempo dado (Gráfico No. 5).

GRAFICO 5

Verificamos que tais valores se dispõem em rectas cuja inclinação sôbre a linha das ordenadas vai aumentando a medida que se consideram tempos maiores de actuação do veneno.

Este facto se verifica devido a ser o grau de proteólise diretamente proporcional à raiz quadrada do tempo de actuação do veneno, como pudemos verificar pelos resultados obtidos.

O mesmo se verifica para com a caseina (Quadro No. III e Gráficos No. 6 e 7) sendo porém neste caso o grau de proteólise directamente proporcional ao tempo de actuação do veneno.

QUADRO III

Veneno em γ por ml de substrato	Leitura				
	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
50	6,5	14 5	22,5	30,5	44,0
100	18,0	31,5	46,0	58,0	76,0
150	29,0	47,5	67,0	80,0	99,0
200	37,5	61,0	78,0	96,0	100,0

Temperatura: — Fazendo-se actuar o veneno sôbre hemoglobina e caseina em temperaturas diversas, observam-se diferentes graus de proteólise. (Quadro n.º IV).

QUADRO IV

Temperatura em º C	Leitura após 302 minutos	
	Hemoglobina	Caseína
25º	1,5	4,0
30º	3,5	11,0
35º	4,5	15,0
40º	3,0	19,0
50º	2,0	25,0
60º	0,0	17,0

A temperatura ótima de actuação do veneno está ao redor de 35ºC para o substrato de hemoglobina e de 50ºC para o de caseina (Quadro No. IV).

Em qualquer das concentrações de veneno com que trabalhamos, o mesmo resultado se verificou (Gráficos No. 8 e 9).

GRAFICO 8

1 — 50 γ de veneno por ml de substrato.
2 — 100 γ " " " " " "
3 — 200 γ " " " " " "

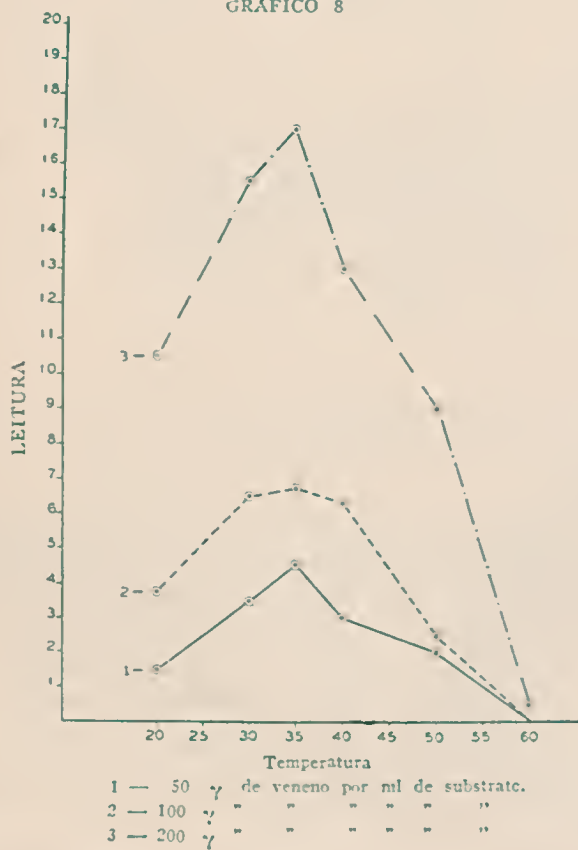
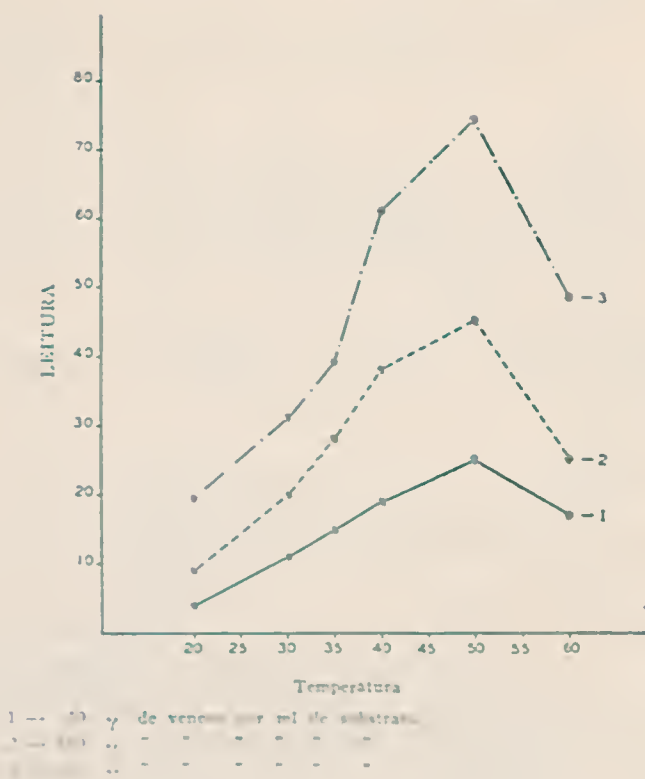



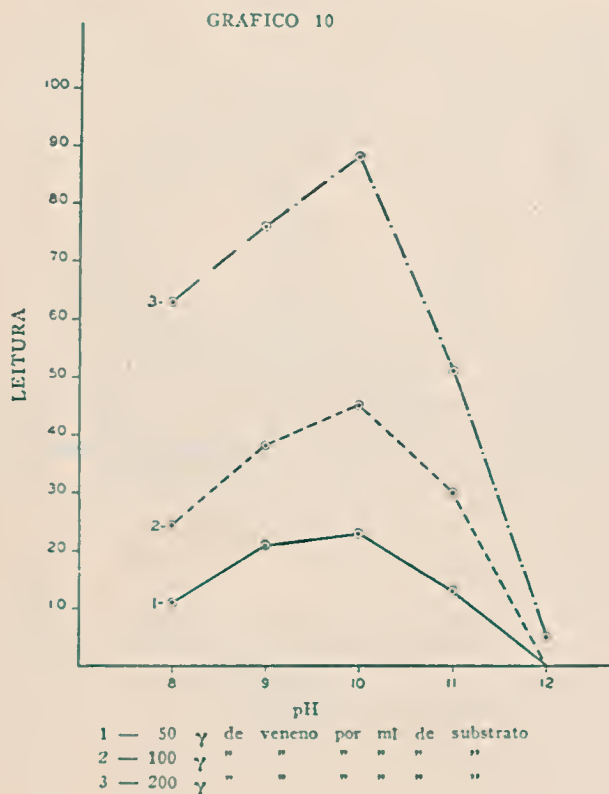
GRAFICO 9

Enquanto que com a hemoglobina obtivemos inactivação aos 60°C, com a caseina, nessa temperatura ainda se observou proteólise pelo veneno.

pH: — Sendo o substrato de hemoglobina um complexo em cuja constituição entram vários elementos bem determinados por Anson (11), estudamos as variações de pH sòmente com a caseina, empregando a hemoglobina preparada de acôrdo com a técnica proposta por aquele autor.

Fizemos variar o pH da caseina de 8 a 12, tamponando as amostras com veronal. Escolhemos essa região alcalina porque a caseina é insolúvel abaixo de pH 8 e o veneno, atuando sôbre uma suspensão não homogênea, determinaria graus diversos de proteólise, ocasionando resultados nem sempre comparaveis

Verificamos (Gráfico No. 10) que o pH ótimo para atuação do veneno sôbre a caseina está ao redor de 10,0 com qualquer das concentrações em que foi empregado, inactivando-se em pH 12,0.

GRAFICO 10

1 — 50 γ de veneno por ml de substrato
2 — 100 γ " " " " " "
3 — 200 γ " " " " " "

DISCUSSÃO

Os venenos ofidicos constituem um complexo de composição variável com a espécie considerada e onde se encontram substâncias responsáveis pelas suas acções tóxicas. Estas acções podem, segundo Kellawey (13), ser atribuidas á presença de: a) enzimas proteolíticas, b) fosfatidases e c) neurotoxinas. A enzima ou enzimas proteolíticas são responsáveis pela acção hemorragipara desses venenos, bem como pela sua actividade hipotensora, devido provavelmente á histamina que libertam nos tecidos.

A actividade proteolítica do veneno de *Bothrops jararaca* se faz sentir sôbre proteinas mais ou menos complexas, cindindo as moléculas até a formação de ácidos aminados. Este facto se verifica tanto para a hemoglobina como para a

caseina, uma vez que em ambos esses substratos se forma tirosina, base por nós empregada para o doseamento do grau de actividade lítica do veneno.

Esse grau de actividade depende de vários fatores a saber:

a) Concentração de veneno
b) Tempo de actuação do veneno sôbre o substrato
c) Temperatura em que se processa a reação
d) pH do substrato

Como se pode verificar pelos nossos resultados, há uma relação direta linear entre concentração de veneno e grau de proteólise. Por outro lado, o grau de lise é proporcional á raiz quadrada do tempo de actuação do veneno no caso de se trabalhar com hemoglobina e simplesmente ao tempo, quando o substrato é a caseina.

Assim sendo, para temperatura e pH fixos, a reação se processa segundo a equação: $L = K. C. \sqrt{t}$ para a hemoglobina e $L = K. C. t$ para a caseina

L = Leitura
C = Concentração de veneno em γ por ml de substrato
t = Tempo de actuação do veneno
K = Constante dependente da atividade do veneno, do pH e temperatura do substrato.

De acôrdo com os nossos resultados obtivemos para K os seguintes valores: 0,0093 para hemoglobina e 0,0049 para a caseina.

Schutz (14) afirma que a quantidade de albumina hidrolizada até peptona pela pepsina num tempo dado, é proporcional á raiz quadrada da concentração de enzima. Outros autores, usando pepsina mais purificada, verificaram porém que a velocidade da reação é diretamente proporcional á concentração de enzima o que, segundo Tauber (15) pode ser considerado fato geral entre as reações enzimáticas.

Os nossos resultados demonstram essa acertiva, permitindo dizer que a reacção do veneno sôbre caseina e hemoglobina segue essa regra geral.

A velocidade das reacções enzimáticas aumenta com a temperatura até um ótimo, acima do qual há um decrescimo até que cessa inteiramente a actividade enzimática.

Tais variações são segundo Arrhenius (14) devidas á presença de duas espécies de moléculas em solução, as activas e as inactivas, que se encontram em equilibrio tautomérico. Esse fato foi também por nós verificado com relação á atividade do veneno. A proteólise da caseina e hemoglobina pelo veneno, aumentou com a temperatura até um ótimo após o qual descreceu, chegando á inactivação da actividade proteolitica.

O mesmo se verifica com relação ao pH. Neste caso o ótimo é variável de acôrdo com as condições de experiência, como substrato de actuação, orígem da enzima, tampão empregado, etc.

Dos fatos expostos, podemos concluir que a acção proteolítica do veneno de *Bothrops jararaca* se processa de acôrdo com as leis que regem as reacções enzimáticas.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Os A.A. estudam a acção proteolítica do veneno da *Bothrops jararaca* tomando hemoglobina e caseina como substratos de actuação. Verificam a influência da variação dos vários fatores que interferem com a reacção, tais como: concentração e tempo de actuação da enzima, pH e temperatura do substrato. Demonstram que a reacção se processa segundo a equação $L = K. C. \sqrt{t}$ para hemoglobina e $L = K.C. t$ para a caseina.

Concluem:

1) O veneno de *B. jararaca* exerce ação enzimática sôbre os substratos de hemoglobina e caseina, determinando a lise das moléculas atė ácidos aminados.

2) Há uma relação linear entre concentração de veneno e grau de proteólise.

3) O grau de proteólise é proporcional á raiz quadrada do tempo de actuação do veneno, quando sôbre o substrato de hemoglobina e directamente ao tempo simplesmente, quando sôbre a caseina.

4) Há um ótimo de temperatura de actuação do veneno que é de 35°C para a hemoglobina e de 50°C para a caseina.

5) O pH ótimo de actuação de veneno sôbre a caseina é de 10.0.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The authors study the proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom on hemoglobin and casein as substrates. They examine the influence of the variation of various reaction factors such as concentration and actuation time of the enzyme, pH and substrates temperature. They show that the reaction proceeds according the equation $L = K. C. \sqrt{t}$ for hemoglobin and $L = K.C.t$ in the case of casein, where "L" is the photometer reading, "C" the venom concentration in μ per ml of substrate, "t" the time of actuation of venom and "K" a constant dependig on the activity of the venom and the temperature and pH of the substrate.

They conclude:

1) *Bothrops jararaca* venom exhibits an enzymatic action on hemoglobin and casein substrates, splitting the molecules up to amino-acids.

2) There is a linear relationship between venom concentration and degree of proteolysis.

3) The degree of proteolysis in proportional to the square root of the time of actuation of the venom, when acting on hemoglobin substrate and to the time of actuation in the case of casein.

4) There is a temperature optimum for the actuation of venom which lies at 35°C for hemoglobin and at 50°C for casein.

5) The optimum pH for the actuation of the venom on casein lies at 10,0.

SUMMAIRE ET CONCLUSIONS

Les auteurs étudient l'action protéolytique du vénin de *Bothrops jararaca*, en prenant l'hémoglobine et la caséine comme des soustraits d'action. Ils éxaminent d'abort l'influence de la variation de tous les divers facteurs qui peuvent alterer la réaction tels que la concentration et temps d'actuation de l'enzyme pH et température du soustrait. Ils démontrent ensuite que cette réaction se dévéloppe selon l'équation $L = K. C. \sqrt{t}$ pour l'hémoglobine et $L = K.C.t.$ pour la caséine.

1) Le vénin de *B. jararaca* a une action enzymatique sur les soustrait d'hémoglobine et de caséine, en décomposant leurs moléeules jusqu'à des acides aminés.

2) Il y a une proportion linéaire entre la concentration du venin qu'il determine protéolyse.

3) Sur le soustrait d'hémoglobine, le dégré de protéolyse est proportionnel à la racine carrée du temps d'action du vénin, tendis que sur la caséine il est directement proportionnel au temps tout simplement.

4) Il y a une température idéale pour l'action du vénin: elle est de 35° pour l'hémoglobine et de 50°C pour la caséine.

5) Le pH idéale pour l'action sur la caséine est de 10,0.

BIBLIOGRAFIA

1. *Fontana, F.* — Traité sur le vénin de la vipere, Florence, 1781, Jaques, G. editeur.

2. *Emery*, — citado por *Dalmou, H.* — Le venin des serpents, Paris, 1906.

2a. *Leydig*, — ibiden.

2b. *Rudolphi* — ibiden.

3. *Lacerda, J. B.* — Leçons sur le vénin des serpents du Brésil, Rio de Janeiro, Lombarets & Cia., 1884.

4. *Wehrmann, C.* — Étude sur le vénin des serpents — *Ann. Inst. Pasteur 12* (8) : 510, 1898.

5. *Houssay, B. A. et Negrette, J.* — Estudios sôbre venenos de serpientes — *Rev. Inst. Bacteriol. de B. Aires* 1: 341, 1917-1918; citado por *Houssay, B. A. y Negrette, J.* (8).

6. *Noc. F.* — Sur quelques proprietés physiologiques des diferents vénins de serpents — *Ann. Inst. Pasteur* 18: 387, 1904.

7. *Brazil, V. & Pestana, B. R.* — Nova contribuição ao estudo do envenenamento ofídico — *Rev. Médica de S. Paulo* 12 (22), 1909.

8. *Houssay, B. A. y Negrette, J.* — Estudios sobre venenos de serpentes — *Rev. Inst. Bacteriol. de B. Aires* 1: 341, 1917-1918.

9. *Taborda, A. & Taborda, L. C.* — Protease do veneno da *Bothrops jararaca* — *Mem. Inst. Butantan* 14: 181, 1940.

10. *Zeller, E. A.* — Enzymes of snake venoms and their biological significance — *Advances in enzymology* 8: 459, 1948.

11. *Anson, M. L.* — The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin — *J. Gen. Physiology* 22: 79, 1938-39.

12. *Folin, O. and Ciocalteau* — On tyrosine and tryptophane determinations in proteins — *J. Biol. Chem.* 73: 627, 1927.

13. *Kellaway, C. H.* — Animal poisons — *Ann. Rev. Biochem.* 8: 545, 1939.

14. Citado por *Tauber, H.* — Enzyme Chemistry, J. Wiley and Sons, 1937.

15. *Tauber, H.* — *Ibid.*

ACÇÃO PROTEOLÍTICA DO VENENO DA *BOTHROPS JARARACA* (WIED)

II. *Acção sôbre a gelatina*

POR I. MARTIRANI & MURILO P. AZEVEDO

(Dos laboratórios de Contrôle e de Imunologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil).

Dentre as várias acções manifestas do veneno da *Bothrops jararaca* destaca-se a acção proteolítica, já bem definida (1,2,3) e estudada (4,14) sob determinados aspectos.

Esta característica enzimática do veneno da *Bothrops jararaca* tem permitido aos autores estabelecer um paralelismo entre a actuação do veneno e da trombina no fenômeno da coagulação do sangue (11,12,13,14,15,16), acções semelhantes na dependência das concentrações de veneno usadas.

A actividade proteolítica do veneno da *Bothrops jararaca* deve ser inherente ao veneno não necessitando de um factor complementar para ser revelada como acontece com as chamadas substâncias fibrinolíticas produzidas por certos estreptococos (17,18,19,20,21,22,23,24), ou então como já reconheceu Loomis, George e Ryder (25), bem como Astrup e Permin (26), a substância produzida pelos estreptococos seria um activador, uma "streptokinase", havendo no sangue uma proenzima a "profibrinolisina", sendo a "fibrinolisina" propriamente a enzima resultante. O veneno da *Bothrops jararaca* não seria nem uma proenzima nem uma "kinase" sua acção é de uma enzima já constituida com pontos de identidade com a tripsina e com a papaina, constituindo assim uma enzima do tipo das endopèptidases (27,28), isto é, enzimas que actuam sôbre substratos de alto pêso molecular e mais especificamente sôbre as cadeias peptidicas terminais, bem como nas cadeias peptídicas centrais.

MATERIAL E MÉTODOS

A verificação da proteólise foi baseada na diminuição da viscosidade da gelatina. O viscosimetro empregado foi do tipo Ostwald.

A gelatina usada foi Difco solução a 6% em salina 0,9% :

Entregue para publicação em 5 de setembro de 1949.

O veneno da *Bothrops jararaca* sêco, liofilizado com uma D.M.M. de 0,000040 para pombo de 250 g, foi empregado em solução recentemente preparada, usando como solvente do veneno a solução salina a 0,9%. A solução tampão empregada foi a de veronal.

Os sistemas proteolíticos foram preparados da seguinte maneira:

a) substrato testemunho — 20 ml da solução de gelatina a 6% são adicionados de 25 ml da solução salina 0,9% e 15 ml da solução tampão; misturar e medir a viscosidade de 20 ml desta mistura;

b) substrato de proteólise — 20 ml da solução de gelatina a 6% são adicionados de 25 ml de solução salina 0,9% contendo o veneno dissolvido na concentração que se deseje actuar, completar para 60 ml juntando 15 ml da solução tampão, misturar e medir a viscosidade em 20 ml desta mistura:

Tanto o sistema proteolítico como o testemunho, no estudo da temperatura, foram diluidos para 120 ml.

O início da experiência foi sempre o momento da mistura final da gelatina seja com solução salina e solução tampão, seja com solução salina, veneno e solução tampão.

A viscosidade foi medida em temperaturas controladas, as leituras iniciais aos 10 min. das misturas e subseqüentemente de 20 em 20 min. até 60 min. das misturas. As leituras foram feitas em triplicata, registando-se as médias. Os pH foram controlados no potenciômetro.

A viscosidade determinada foi a cinemática expressa em centistokes e calculada pela seguinte fórmula quando a temperatura da experiência foi de 37°C.

$$Nc = \frac{Na}{D} = kt \qquad Na = D \times k \times t \qquad k = \frac{Na\ 37°C}{D\ 37°C \times t'}$$

Nc = viscosidade cinemática
Na = viscosidade absoluta da água a 37°C = 16,947 milipoies
D = densidade da água a 37°C = 0,993 g/ ml
t = tempos em segundos.
k = fator do aparelho.

No plano de trabalho verificamos primeiramente, num determinado pH, 8,0 mantida constante a temperatura 37°C, se a diminuição da viscosidade do substrato pela acção do veneno da *Bothrops jararaca* era função da dóse do veneno empregado. Procurou-se ao mesmo tempo determinar um ótimo de concentração do veneno capaz de promover alterações bem evidentes na viscosidade.

A seguir foi estudado o pH ótimo de atuação, utilizando a dóse ótima de veneno, mantendo a temperatura constante, 37°C.

QUADRO I

Actividade proteolítica de veneno sôbre a gelatina em função da dóse

Tempo das Medidas	1 γ de veneno			5 γ de veneno			10 γ de veneno			20 γ de veneno			50 γ de veneno		
	V 1			V 2			V 1			V 1			V 2		
	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L
10 min	15	14,1	0	152	14,3	1,2	41	14,1	4,3	37	11,8	34,9	121	11,4	40,5
20 min	45	11,4	0	148	13,9	6,3	41	13,1	17,4	36	11,5	39,1	103	9,7	63,3
40 min	45	11,4	0	145	13,6	10,1	38	12,2	20,4	34	10,9	47,8	100	9,4	67,1
60 min	44	11,1	1,2	137	12,9	20,3	35	12,2	43,9	32	10,3	56,5	93	8,7	76,0

Tempo das Medidas	100 γ de veneno			150 γ de veneno			200 γ de veneno			Testemunho viscosimetro 1			Testemunho viscosimetro 2		
	V 1			V 1			V 1								
	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L
10 min	32	10,	56,5	31	9,9	60,9	26	8,3	82,6	45	14,4	0	153	14,1	0
20 min	30	9,6	65,2	28	9,0	73,9	26	9,3	82,6	45	14,4	0	153	14,1	0
40 min	29	9,3	69,6	27	8,6	78,2	26	8,3	82,6	45	14,4	0	153	14,1	0
60 min	27	8,6	78,2	26	8,3	82,6	26	8,3	82,6	45	14,4	0	153	14,4	0

T = Tempo de queda da gelatina em segundos
C = Velocidade cinemática em centistokes
L = Lise por cento
V 1 = Viscosimetro No. 1 — Factor a 37°C = 0,32
V 2 = Viscosimetro No. 2 — Factor a 37°C = 0,094
Viscosimetro No. 1 queda da água a 37°C = 22s
Viscosimetro No. 2 queda da água a 37°C = 77s

Daí então procurou-se saber qual a temperatura ótima de actuação empregando-se a dóse ótima. Depois então procurou-se verificar a proteólise em função da concentração do substrato.

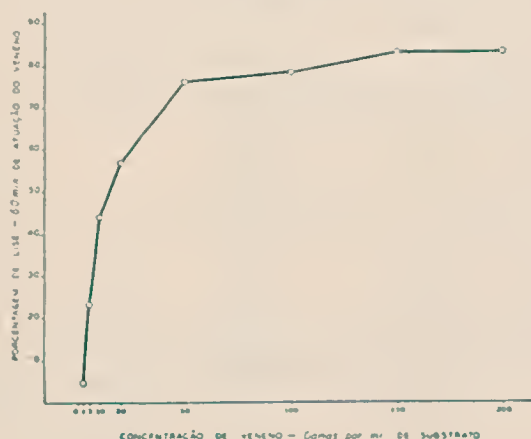
Para melhor clareza os resultados alem de serem expressos em centistokes são apresentados em percentagem de lise, considerando-se 0% de lise a velocidade de queda do testemunho diminuido da velocidade de queda da água distilada. O cálculo é o seguinte:

$$A\text{-}a = A' \cdot \quad B\text{-}a = B' \qquad \%\ \text{de lise} = \frac{100\ (A' - B')}{A'}$$

A = velocidade da queda do testemunho
B = velocidade de queda da gelatina com veneno
a = velocidade de queda da água.

RESULTADOS

1) *Viscosidade da solução de gelatina em função de doses crescentes de veneno. Temperatura constante de 37°C e pH constante de 8.5.*

GRAFICO 1

O gráfico I representa a percentagem da solução de gelatina ás várias concentrações de veneno ao fim de 60 minutos.

Escolhemos este tempo afim de eliminar as variações inevitáveis, apesar dos cuidados, que se apresentam no início das experiências, quando ainda não houve uma perfeita homogeinização do sistema.

2) *Viscosidade da solução da gelatina em função do pH. Dose de veneno por ml de substrato 20 γ (0,000020 g). Temperatura constante de 37°C.*

O gráfico II nos dá a lise de substrato de gelatina em função dos vários pH. Nestas experiências, quando o testemunho apresentava variações, o valor tomado para o cálculo da lise era mais baixo.

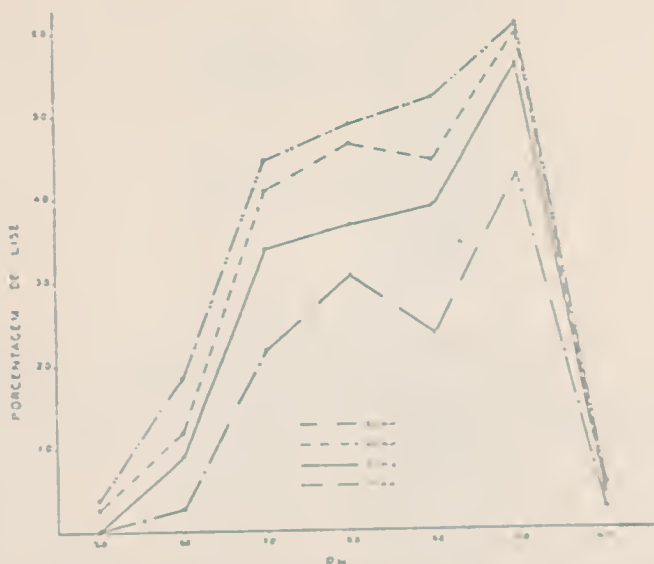
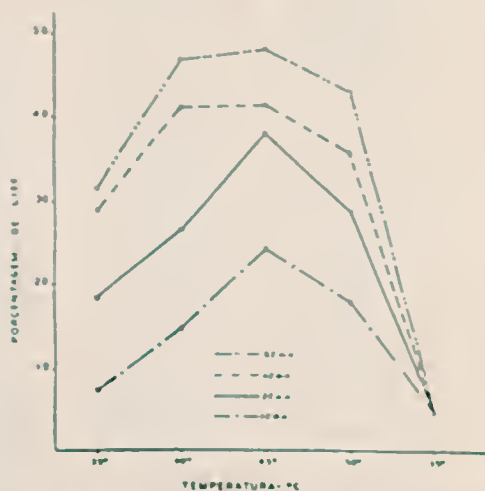
GRAFICO 2

3) *Viscosidade da solução de gelatina em função da temperatura. Dóse de veneno por mil de substrato* 20 γ *(0,000020) e pH constante de* 8,0. Nesta série de experiências o preparo de substratos, seja testemunho seja de proteólise, diferiu das outras experiências, constando do seguinte:

GRAFICO 3

a) substrato testemunho: 20 ml da solução de gelatina a 6% são adicio-

QUADRO III

Actividade proteolítica do veneno sôbre a gelatina em função da temperatura

Tempo das medidas	Temperatura 35oC						Temperatura 40oC						Temperatura 45oC						Temperatura 50oC						Temperatura 55oC					
	Fator do aparelho - 0,098 Queda da água - 74 s						Fator do aparelho - 0,096 Queda da água - 69 s						Fator do aparelho - 0,091 Queda da água - 61 s						Fator do aparelho - 0,093 Queda da água - 60 s						Fatôr do aparelho - 0,092 Queda da água - 56 s					
	Testemunho			Subs. proteolise			Testemunho			Subs. proteolise			Testemunho			Subs. proteolise			Testemunho			Subs. proteolise			Testemunho			Subs. proteolise		
	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L
10 min	112"	11,0	0	109"	10,7	7,9	103"	9,9	0	96"	9,4	14,7	93"	8,7	0	86"	8,1	24,1	88"	8,2	0	83"	7,7	17,8	77"	7,1	0	76"	7,0	4,8
20 min	112"	11,0	0	105"	10,3	18,4	108"	9,9	0	94"	8,9	26,5	93"	8,7	0	82"	7,7	37,9	88"	8,2	0	80"	7,4	28,6	77"	7,1	0	76"	7,0	4,8
40 min	112"	11,0	0	101"	9,9	28,9	103"	9,9	0	89"	8,5	41,1	93"	8,7	0	81"	7,6	41,1	88"	8,2	0	78"	7,2	35,7	77"	7,1	0	76"	7,0	4,8
60 min	112"	11,0	0	100"	9,9	31,5	103"	9,9	0	88"	8,4	47,0	93"	8,7	0	79"	7,4	48,2	88"	8,2	0	76"	7,1	42,9	77"	7,1	0	76"	7,0	4,8

T = Tempo de queda da gelatina em segundos

C = Velocidade cinemática em centistokes

L = Lise por cento.

QUADRO II

Actividade proteolítica do veneno sôbre a gelatina em função do pH

Tempo das medidas	pH 5,0 Testemunho T	C	L	pH 5,0 subs. proteolise T	C	L	pH 6,0 Testemunho T	C	L	pH 6,0 subs. proteolise T	C	L
10 min	147	14,1	0	147	14,1	0	149	14.3	0	147	14,1	2,7
20 min	147	14.1	0	147	14,1	0	149	14,3	0	143	13,7	8,0
40 min	147	14,1	0	145	13.9	2,7	149	14,3	0	140	13,4	11,9
60 min	147	14,1	0	144	13,8	3,9	149	14,3	0	136	13,0	18,4

Tempo das medidas	pH 7,0 Testemunho T	C	L	pH 7,0 subs. proteolise T	C	L	pH 8,0 Testemunho T	C	L	pH 8,0 subs. proteolise T	C	L
10 min	156	15,0	0	138	13,2	21,7	155	14,9	0	130	12,5	30,5
20 min	156	15.0	0	128	12,3	33,7	155	14,9	0	125	12,0	36,6
40 min	156	15,0	0	122	11,7	40,9	155	14,9	0	.17	11,2	46,3
60 min	156	15,0	0	119	11,4	44,6	155	14,9	0	115	11,0	48,3

Tempo das medidas	pH 9,0 Testemunho T	C	L	pH 9,0 subs. proteolise T	C	L	pH 10,0 Testemunho T	C	L	pH 10,0 subs. proteolise T	C	L
10 min	145	13,9	0	128	12,3	23,6	155	14,9	0	120	11,5	42,7
20 min	145	13,9	0	117	11,2	38,8	55	14,9	0	109	10,4	56,1
40 min	145	13,9	0	113	10,8	44,4	155	14,9	0	106	10,2	59,8
60 min	145	13,9	0	108	10,3	51.9	155	14,9	0	105	10.1	60,9

Tempo das medidas	pH 11,0 Testemunho T	C	L	pH 11,0 subs. proteolise T	C	L
10 min	149	14,3	0	147	14,1	2,6
20 min	149	14,3	0	146	14,0	3.9
40 min	149	14,3	0	146	14,0	3,9
60 min	149	14,3	0	145	13,9	5,3

T = Tempo de queda da gelatina em segundos
C = Velocidade cinemática em centistokes
L = Lise por cento
Viscosimetro N.º 3 — Factor do aparelho a 37°C = 0,096
Queda da água a 37°C = 73s.

nadas de 85 ml de solução salina 0,9%, e 15 ml da solução tampão, misturar e medir a viscosidade de 20 ml desta mistura.

b) substrato de proteólise: 20 ml da solução de gelatina a 6% são adicionados de 85 ml de solução salina 0,9% contendo veneno dissolvido na concentração fixa de 20 γ por ml de substrato, completar para 120 ml juntando 15 ml da solução tampão, misturar e medir a viscosidade em 20 ml da mistura.

4) *Actividade proteolítica do veneno sôbre soluções de gelatina de concentrações variadas. Dóse de veneno por ml de substrato* 20 γ (0,000020 g) *pH constante de* 8,0. *Temperatura constante de* 37°C. Nesta série de experiências os substratos foram preparados de acôrdo com o quadro abaixo.

QUADRO IV

PREPARO DOS SUBSTRATOS

	Solução de gelatina a 6%	Tampão de veronal	Solução salina a 0,9 %	Veneno
Substrato 1 %	10 ml	15 ml	35 ml	0,0012 γ
Substrato 2 %	20 ml	15 ml	25 ml	0,0012 γ
Substrato 3 %	30 ml	15 ml	15 ml	0,0012 γ
Substrato 4 %	40 ml	15 ml	5 ml	0,0012 γ

Com os substratos assim preparados, empregando um mesmo viscosímetro obtivemos os resultados que estão expostos no quadro V.

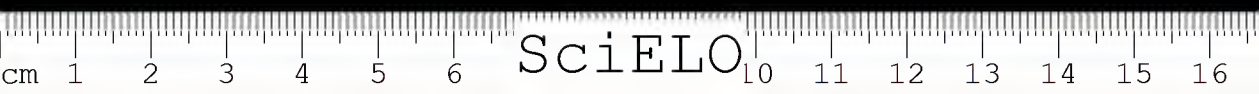
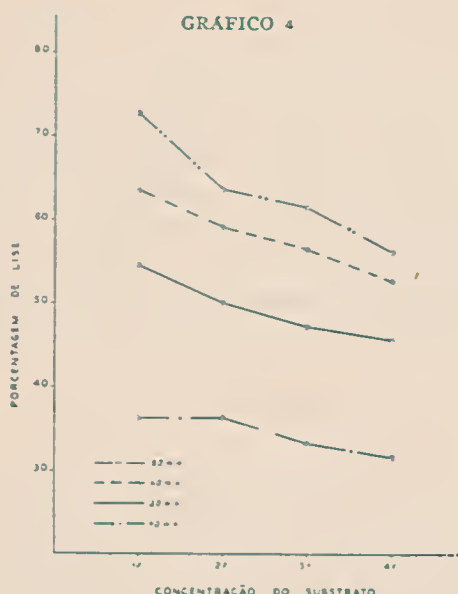



GRÁFICO 4

No gráfico 4, estão representados os valores da proteólise em percentagem de lise após 10,20,40 e 60 minutos de actuação do veneno nas várias concentrações de substrato.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nos induzem a caracterizar no veneno da *B. jararaca* uma atividade enzimática proteolítica. Esta caracterização se fundamenta nos elementos experimentais que são peculiares às reações enzimáticas:

a) acção sôbre um substrato adequado

b) acção progressivamente crescente com o aumento da concentração da enzima.

c) ótimo de pH de actuação

d) ótimo de temperatura de actuação

e) redução de actividade da enzima pelo aumento da concentração do substrato.

O complexo enzimático do veneno da *B. jararaca*, considerando o substrato por nós empregado, se enquadra no tipo das proteinases ou melhor das endopeptidases, se assemelhando pelo pH de actuação a acção da tripsina, que conforme Bergmann e Fruton (27) actua nas cadeias peptidicas que apresentam o grupo carboxílico seja da lisina ou da arginina.

A acção enzimática do veneno da *B. jararaca* sôbre um substrato adequado isto é, de natureza proteica já tem sido apontado por vários autores (1,4,14) e

QUADRO V

Actividade proteolítica do veneno sôbre a gelatina em concentrações várias

Tempo das medidas	Substrato a 1 %						Substrato a 2 %						Substrato a 3 %						Substrato a 4 %					
	Subst. testemunho			Subst. de atuação			Subst. testemunho			Subst. de atuação			Subst. testemunho			Subst. de atuação			Subst. testemunho			Subst. de atuação		
	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L	T	C	L
10 min	32	10,6	0	28	9,2	36,3	42	13,9	0	35	11,5	36,3	60	19,8	0	47	15,5	33,3	78	25,7	0	60	19,8	31,6
20 min	32	10,6	0	26	8,6	54,5	42	13,9	0	32	10,6	50,0	60	19,8	0	42	13,9	47,2	78	25,7	0	52	17,2	45,6
40 min	32	10,6	0	25	8,2	63,6	42	13,9	0	30	9,9	59,1	60	19,8	0	38	12,5	56,4	78	25,7	0	48	15,8	52,6
60 min	32	10,6	0	24	7,9	72,7	42	13,9	0	29	9,6	63,6	60	19,8	0	36	11,9	61,5	78	25,7	0	46	15,2	56,1

T = Tempo de queda da gelatina em segundos

C = Velocidade cinemática em centistokes

L = Lise por cento

Viscosimetro N.° 4 — Factor a 37°C = 0,33

Queda da água a 37°C = 21s.

nas nossas experiências vemos que esta acção é claramente demonstrada sôbre a gelatina.

O estudo do gráfico 1 nos permite admitir dentro dos limites do erro biológico, nas doses menores de veneno, uma proporcionalidade entre as concentrações do veneno e a actividade do mesmo. Após a dóse de 10 gamas de veneno por ml de substrato, a curva da atividade torna-se decrescente devido a uma diminuição da quantidade de substrato a ser proteolizado, chegando nas concentrações de 150 e 200 gamas de veneno por ml de substrato a um máximo, onde o tempo de escoamento da gelatina no viscosímetro é de 26 segundos, bastante próximo do tempo de escoamento da água distilada que é de 22 segundos.

O gráfico 2 nos informa da influência do pH sôbre a actividade proteolitica do veneno. Podemos definir perfeitamente uma zona ótima de actuação entre os pH 8,0 e 10,0, com inactivação total no pH 11,0. Nos pH baixos também esta actividade está muito reduzida, aumentando a medida que o pH aumenta.

A acção da temperatura, gráfico 3, é bem definida sôbre a actividade do veneno. Para o substrato por nós empregado determinamos o ótimo de temperatura a 45°C. Tanto abaixo como acima deste ótimo, há uma diminuição da actividade do veneno em consequência de causas diversas. Nas temperaturas baixas há uma interferência com a reação catalizadora que fica inibida, o aumento da temperatura se acompanha sempre de um aceleramento da reacção. As temperaturas acima de 45°C também acarretam um evidente decrescimo da actividade do veneno, indicando não mais uma inibição da reacção catalizadora porem uma real inactivação do complexo enzimático do veneno.

No gráfico 4, é evidente a redução da actividade do complexo enzimático do veneno pelo aumento da concentração do subtrato.

Notamos em conjunto que a demonstração da actividade proteolítica do veneno pelo processo empregado é muito simples e bastante sensível, pois concentrações mínimas de veneno 0,000001 por ml de substratos são suficientes para determinarem evidentes alterações na viscosidade do substrato.

RESUMO E CONCLUSÕES

Os autores estudam a actividade proteolítica do veneno da *B. jararaca* (Wied) usando como substrato uma solução de gelatina. Empregam o método da viscosimetria com um aparelho do tipo Ostwald.

A proteólise da solução de gelatina pelo veneno foi estudada em função da concentração do veneno, do pH, da temperatura e da concentração do soluto de gelatina.

Nas condições experimentais utilizadas chegaram ás seguintes conclusões:

1) o veneno de *B. jararaca* (Wied) exerce acentuada actividade proteolítica sobre uma solução de gelatina.

2) há relativa proporcionalidade entre a actividade proteolitica e as concentrações baixas de veneno.

3) a actividade proteolítica do veneno cresce progressivamente a partir do pH 5,0 atingindo o máximo no pH 10,0, sendo praticamente nula no pH 11,0.

4) a actividade proteolitica do veneno é progressivamente crescente a partir da temperatura de 35°C, com um ótimo a 45°C, diminuindo acentuadamente a temperatura de 55°C.

5) a actividade proteolítica do veneno está em função da concentração do substrato.

6) a actividade proteolítica do veneno sôbre o substrato de gelatina é direta, não exigindo a presença de um fator complementar.

7) O processo empregado demonstrou grande sensibilidade.

ABSTRACT

The authors studied the proteolytic action of *Bothrops jararaca* (Wied) venom on a gelatine substrate by means of a viscosimetric method using an apparatus of the Ostwald type.

They observed the proteolysis of the gelatin solution by the venom as a function of the venom concentration, pH, temperature and substrate concentration.

They conclude that under their experimental conditions:

1) *B. jararaca* venom excerts a pronounced proteolytic action on a gelatin solution;

2) There is a direct relation between the proteolytic activity and low venom concentrations;

3) The proteolytic activity increases from pH 5.0 to a maximum at pH 10,0, disappearing at pH 11,0;

4) The proteolytic activity increases with temperature from 35°C to a maximum at 45°C, disappearing et 55°C.

5) The proteolytic activity is a function of the substrate concentration;

6) The proteolytic action of the venom on the gelatin substrate is direct and does not require any a complementary factor;

7) The method used is extraordinarily sensitive.

RESUMÉ ET CONCLUSIONS

Les auteurs étudient l'activité protéolytique du vénin de la *B. jararaca* (Wied) en utilizant comme soustrait une solution de gélatine. Ils employent la méthode de la viscosimetrie avec um appareil du type Ostwald.

La protéolyse de la solution de gélatine par le vénin fut étudiée en fonction de la concentration de celui-ci, du pH, de la température et de la concentration du delié de gélatine.

Dans les conditions expérimentelles utilizées ils ont abouti aux conclusion suivantes.

1) Le vénin de *B. jararaca* (Wied) a une activité protéolytique accentuée sur une solution de gélatine.

2) Il y a une rélative proportionnalité entre l'activité protéolytique et les faibles concentrations du vénin;

3) L'activité protéolytique du vénin croit progréssivement à partir du pH 5,0, en atteignant le "maximum" au pH 10,0 étant pratiquement nule au pH 11,0.

4) L'activité protéolytique du vénin croit progréssivement à partir de la température de 35°C, ayant son "maximum" a 45°C, et dimminuant sensiblement à la température de 55°C.

5) L'activité protéolytique du vénin se rapporte toujours à la concentration du soustrait.

6) L'activité protéolytique du vénin sur le soustrait de gélatine est directe, n'éxigent pas la présense d'un facteur complémentaire.

7) Le procées employé a démontré une grande sensibilité.

BIBLIOGRAFIA

1. *Houssay, B. A. y Negrete, J.* — Estudios sobre los venenos de serpientes. III. Action de los venenos de serpientes sobre las substancias proteicas — *Rev. Inst. Bacteriologico* 1: 341, 1918.
2. *Houssay, B. A. et Sordelli, A.* — Action des venins sur la coagulation sanguine. — *J. Physiol. et de pathol. gen.* 18: 78, 1919.
3. *Houssay, B. A.; Otero, M. J.; Negrete, J. y Mazzoco, P.* — Action des venins coagulants de serpents sur le sang — *C. R. Soc. Biol.* 86: 411, 1922.
4. *Taborda, A. e Taborda, L. C.* — Proteose do veneno de *Bothops jararaca* — *Mem. Inst. Butantan* 14: 181, 1940.
5. *Lacerda, J. B.* — Leçons sur le venin des serpents du Brésil — Rio de Janeiro,
6. *Launoy, L.* — Sur l'action protéolitique des venins — *C. R. Acad. Sciences* 135:401, 1902.
7. *Brazil, V. e Rangel Pestana, B.* — Nova contribuição ao estudo do envenenamento Lombaerts, 1884. ophidico — *Col. Trab. Instituto Butantan* 1 : 151, 1901-07.
8. *Delezeme, C.* — Les diastases protéolytiques coagulants des venins. — *Bull. Acad. Med.* (6 dez.), 1910.

9. *Calmette, A.* — Les venins, Paris, Massons et Cie., 1907.

10. *Noc, F.* — Sur quelques propriétés physiologiques des différents venins de serpents — *Ann. Inst. Pasteur* 18: 387, 1904.

11. *Vaz, E. e Pereira, A.* — Ação hemocoagulante pelo veneno de *B. jararaca* — *An. Inst. Pinheiros* 4: 3, 1939.

12. *Eagle, H.* — Recents advances in the blood coagulation problem — *Medicine* 16: 95, 1937.

13. *Eagle, H.* — The coagulation of blood by snake venoms and its physiologic significance — *J. of Exper. Med.* 75: 613, 1937.

14. *Martirani, I.* — Ação do veneno de *B. jararaca* sôbre alguns constantes fisicoquímicos e indices hematológicos — *An. Inst. Pinheiros* 8: 69, 1946.

15. *Hanut, C. J.* — Contribution a l'étude des effects du venin de *Crotalus terrificus* et des venins des différents espèces de *Bothrops* sur la coagulation du sang "*in vitro*" — *Bull. Inst. Pasteur* 38: 36, 1940.

16. *Vaz, E.; Pereira, A. e Martirani, I.* — Controle dos hemocoagulantes — *An. Inst. Pinheiros* 8: 87, 1945.

17. *Christensen, L. R.* — Streptococcal Fibrinolysis: a proteolitic reaction due to a serum enzyme activaved by streptococcal fibrinolysis — *J. Gen. Physiol.* 28: 363, 1944-45.

18. *Garner, R. L. and Tillett, W. S.* — Biochemical studies on the fibrinolytic activity of hemolytic streptococci — *J. Exper. Med.* 60: 255, 1934.

19. *Tillet, W. S. and Garner, R. L.* — The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. — *J. Exper. Med.* 58: 485, 1933.

20. *Christensen, L. R. and MacLeod, C. M.* — A proteolytic enzyme of serum: characterization, activation and reaction with inhibitor — *J. Gen. Physiology* 28: 559, 1944-45.

21. *Halmberg, C. G.* — Cleavage of fibrin by fibrinolysin from hemolytic streptococci — Resumo do *Chem. Abstracts* 39: 3013, 1945.

22. *Kaplan, M. H.* — Nature and role of the lytic factor in hemolytic streptococcal fibrinolysis — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 57: 40, 1944.

23. *Van Deventer, J. K. and Reich, T.* — Antihuman fibrinolytic streptococci — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 31: 821, 1934.

24. *Tilstone, H.* — A factor in normal human blood which participales in streptococcal fibrinolysis — *J. Immunology* 42: 109, 1941.

25. *Loomis, George C. and Ryder, A.* — Fibrinolysin; nomenclature, unit, assay, preparation and properties — *Arch. Bioch.* 12: 1, 1947.

26. *Astrup, T. and Permin, P. M.* — Fibrinolysis in the animal organism — *Nature* 159: 681, 1947.

27. *Bergmann, M. and Fruton, J. S.* — The Specificity of proteinases — in *Advances in Enzymology* 1: 63, 1941.

28. *Bergmann, M.* — A classification of proteolytic enzymes — in *Advances in Enzymology* 2: 49, 1042.

SOBRE DOIS BATRÁQUIOS DA ILHA DOS ALCATRAZES

POR ARISTOTERIS T. LEÃO

(*Trabalho da Secção de Zoologia Médica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil*)

Prosseguindo no nosso programa de excursões, fizemos uma viagem à Ilha dos Alcatrazes, situada a cerca de 50 milhas da barra de Santos e a mais ou menos 20 milhas da Ilha de São Sebastião, estando esta de permeio entre o litoral e a primeira.

A viagem foi realizada entre 11 e 27 de feveriro de 1948, num barco gentilmente posto à nossa disposição pela Escola de Pesca, da Secretaria da Agricultura.

A Ilha dos Alcatrazes não é haibtada, possue agua potavel. E' completamente desprovida de praias, circundada por enormes rochedos e recoberta por densa vegetação, especialmente nas depressões e encostas, servindo de abrigo seguro para os "mergulhões" (*Sula leucogaster*), "gaivotas" (*Larus* sp.) e, principalmente, aos "alcatrazes" (*Fregata minor*) que aí nidificam. São vistas muitas palmeiras, bromelias, pitas, cactus, etc.

Sofremos durante a estadia naquela ilha uma canícula surpreendente, pois a temperatura oscilava sempre em torno de 39-42°C (Maxima 44,5°C e minima 25°C).

Na Ilha dos Alcatrazes encontramos somente dois batráquios — uma *Hyla* e um *Leptodactylus* — que constituem a razão destas notas.

Leptodactylus nanus

Cabeça lanceolada, às vezes achatada dorso-ventralmente, pouco mais longa do que larga. Boca de hiato começando no bordo posterior do olho e anterior do t4ímpano. Focinho, saliente, com narinas na extremidade do lóro. Canto rostral apenas perceptivel, arqueado. Lôro pouco excavado. Timpano pouco profundo, circular, cerca da metade do diâmetro ocular; com uma prega supratimpanica que, partindo do bordo posterior do olho se dirige em linha reta no sentido do comprimento e, ao alcançar o bordo posterior do timpano desvia

Entregue para publicação em 5 de outubro de 1949.

bruscamente para baixo, formando um angulo obtuso e terminando na face superior do ante-braço. Olho saliente, com pupila horizontal, circular. Dentes vomerinos em duas fileiras retas, transversais, bem posteriores às coanas, com cerca de 6-8 dentes em cada lado. Coanas pequenas, circulares, com abertura dirigida para fóra. Pré-maxilares em ponta internamente, as quais não se tocam, com dentição uniforme, sendo mais ou menos 6 dentes em cada peça. Maxilares com dentição uniforme. Mandibula edentula. Lingua piriforme, pouco entalhada, livre posteriormente, às vezes com uma constricção na base, sendo, portanto, mais longa posteriormente. Aparelho esternal do tipo arcifero; omosterno osseo, com dilatação terminal cartilaginosa, em forma de pá. Aparelho hidoideo constituido por duas peças anteriores cartilaginosas, de concavidade para fóra, divergentes, portanto, e por duas peças osseas divergentes, com dilatação nas epifises e diafises, ligadas anteriormente por uma cartilagem. Dedos inteiramente livres, não fimbriados, com tuberculos sub-articulares bem desenvolvidos; calo metacarpal interno oval, inteiro; calo metacarpal externo maior, esferoide, inteiro; ultima falange normal: 1.º artelho sem dilatação aparente; 2.º, 3.º e 4.º artelhos bem dilatados, especialmente o 3.º e o 4.º que são providos de discos achatados dorso-ventralmente e recurvados para cima; 5.º artelho com dilatação apenas perceptivel; ordem de tamanho dos artelhos: 1, 2, 5, 3, 4; articulação tibio-tarsal alcançando o timpano. Disco ventral evidente. Corpo totalmente liso, com granulação bem evidente apenas na face posterior das coxas, às vezes algumas verrugas esparsas no 1/2 posterior do corpo. Estrias laterais frequentemente bem rugosas, dando mesmo a impressão de uma saliencia uniforme. Tarso com face inferior rugosa.

Coloração (alcool): — Coloração de fundo variavel desde o bruneo quase negro ao marmoreo-rosado ou marron com tonalidades roseas; u'a mancha escura na cabeça, tocando as palpebras, em forma de calice de pé bifido, que alcança a espadua; duas manchas ou estrias laterais que, partindo das espaduas seguem em linha reta e vão tocar as virilhas, ou, às vezes, se interrompem na altura do meio do urostilo; o resto do dorso e lados providos de pequenas manchas irregulares escuras, dando ao todo uma impressão marmorea; membros anteriores e posteriores tarjados de escuro dorsalmente; face inferior dos membros pintalgada de marron; abdomen alvadio; região gular com sombra marron-clara ou escura; região loreal, canto rostral e focinho com tonalidade acinzentada.

Coloração (vivos): — Parte ventral do corpo e dos membros alvadia. Dorso cinzento- esverdeado com reflexos azulados; região loreal mais escura; duas faixas laterais amarelo-avermelhadas ou bem escuras, com bordos amarelados que, partindo dos olhos vão até os membros posteriores; membros com faixas transversais (tarjas) escuras, dorsalmente.

Ha grande variedade na tonalidade das cores, havendo exemplares onde predominancia do avermelhado ou rosado intenso ou mesmo bruneo quase negro ou ainda acinzentado. Ventre creme ou amarelado.

Voz: — Ti — Ti — Ti — Ti — ou Pi — Pi — Pi — Pi — que se repetem rapidamente, em cerca de 1 segundo.

Habitat: — Vivem no chão, debaixo das folhas mortas ou em buracos, em sitios bem humidos e sobreados.

Nota: Encontramos no chão (buraco), a cerca de 25cm de profundidade u'a massa espumosa contendo ovos grandes, creme, sem pigmentação, que supomos pertencer a esta especie.

DISCUSSÃO

Lutz (1926) descreveu uma especie de *Leptodactylus*, *L. trivittatus* de material colhido na mesma região que o *L. nanus*, dando a seguinte descrição:

> "Esta especie é, sem duvida, muito vizinha do *L. nanus* no tamanho e na biologia, mas as differenças tanto do desenho como da coloração, e a falta de transição não permitte reunil-as. Foi encontrada nas mesmas regiões, mas em pontos differentes. O *trivittatus*, observado vivo, mostra muita tendencia a esconder-se durante o dia.
>
> A femea adulta mede cerca de 22mm em comprimento. A lingua é livre atraz e os dentes vomerinos formam dois pequenos grupos rectilineos com pequeno intervalo.
>
> No dorso do tronco ha tres estrias longitudinais de côr terracota ou um pouco mais vermelhos. A dorso-mediana limita-se à metade posterior do dorso. As laterais principiam sobre a palpebra superior e terminam pouco antes da prega inguinal. Nos ultimos 4mm a côr avermelhada vira em crême. A mesma côr apparece numa fita sinuosa que principia abaixo do olho e acaba na raiz do braço. Passando por baixo do timpano, torna-se mais estreita. A côr terracota apparece tambem no lado dorsal do cotovelo e joelho, extendendo-se sobre as partes vizinhas. Num exemplar menor a estria mediana invade tambem a metade anterior do dorso, tornando-se mais fina e interrompida.
>
> Tenho um exemplar do Alto da Serra de Cubatão e alguns de Campo Belo, encontrados dous debaixo de tronco de arvores derrubadas e outros no capim. Não se conhece a voz".

Tinha razão Lutz ao considerar a sua especie muito vizinha de *L. nanus*, pois esta apresenta extensa variedade na tonalidade do seu colorido, especialmente os jovens que mostram aquela coloração avermelhada das faixas laterais que talvez tenha sido uma das causas mais salientes no estabelecimento do *L. trivittatus*.

Bertha Lutz (1947) assim se exprime sobre estas duas especies:

> "*Leptodactylus nanus*, including *L. trivittatus*, which is probably a colour-phase........"

Temos mais de uma centena de exemplares, capturados todos num espaço de menos de 200^{m^2}, na Ilha dos Alcatrazes, nos quais são vistos os mais variados tipos de tonalidade e desenho. Pode-se mesmo com certa facilidade separar 4 tipos diferentes: a) acinzentados, com máculas pouco visiveis ou mesmo negroides; b) os mesmos acima referidos, porém, com o tegumento notavelmente mais claro, cujas máculas aparecem com nitidez; c) em *c* se enquadram os representantes de *a* e *b* que possuem 2 faixas laterais claras; d) exemplares pequenos, iguais aos precedentes tendo, todavia, as faixas laterais ávermelhadas ou roseas e que representa com notavel semelhança o *L. trivittatus* de Lutz.

Não encontrando nenhum elemento que nos autorize proceder de modo contrario, consideramos o *L. trivittatus* sinonimo de *L. nanus*, representando o primeiro, como bem pondera Bertha Lutz (*loc. cit.*), apenas uma fase de colorido do segundo que, aliás, possue todas as caracteristicas de especie polimórfica.

Hyla sp.

Hyla de tamanho medio. Cabeça sub-circular, com comprimento e largura quase iguais. Boca com hiato começando na altura do bordo anterior do timpano. Focinho saliente, recurvado para cima, com as narinas na extremidade do lôro, havendo entre ambas um sulco. Canto rostral bem evidente, com lôro regularmente excavado. Timpano na superficie da pele, às vezes ligeiramente acima desta, circular, pouco menor que a metade de um diametro ocular longitudinal; uma prega supra-timpanica que começando no bordo posterior do olho arqueia-se levemente e vai tocar a face superior do ante-braço. Olho saliente, com pupila oval, horizontal. Dentes vomerinos em duas fileiras mais ou menos retas, quase se tocando, com 6-7 dentes em cada lado, situadas pouco antes do meio das coanas. Coanas ovoides, de tamanho relativo, de abertura francamente para fóra. Pré-maxilares em ponta internamente, estas recurvadas para cima, com dentição uniforme, em 16 em cada fileira. Maxilares com dentição uniforme. Mandibula edentula. Lingua semi-circular ou cordiforme, pouco entalhada e livre posteriormente. Aparelho esternal do tipo arcifero; omosterno cartilaginoso,

com dilatação em forma de pá de ponta romba; xifisterno cartilaginoso, em forma de cavadeira, de ponta quadrangular. Aparelho hioideo constituido por duas peças osseas recurvadas para dentro, ligadas anteriormente por uma cartilagem, com extremidades basais dilatadas e distais redondas e finas. Dedos inteiramente livres, fimbriados, com tuberculos sub-articulares evidentes; calo metacarpal interno pouco saliente, longo, fino, inteiro; calo metacarpal externo saliente, grande, dividido até o meio, de ponta externa mais longa que a interna; ultima falange dilatada, provida de disco adesivo bem desenvolvido, achatado no sentido dorso-ventral, recurvado para cima; ordem de tamanho dos dedos: 1, 4, 2, 3. Artelhos palmados, fimbriados, com tuberculos sub-articulares evidentes; calo metatarsal interno saliente, ovoide, inteiro; calo metatarsal externo esferoide, bem menor que o interno (cerca de 1/4 do tamanho daquele), inteiro; 1.º e 2.º artelhos livres, 2.º e 3.º com membrana apenas até a 1.ª articulação, 3.º e 4.º e 4.º e 5.º com membrana até a 2.ª articulação; ultima falange dilatada, provida de um disco adesivo bem desenvolvido, achatado dorso-ventralmente, recurvado para cima; ordem de tamanho dos artelhos: 1, 2, 3, 5, 4; articulação tibiotarsal alcançando o meio do lôro. Face dorsal do corpo com granulações esparsas; cabeça com granulação mais intensa que o corpo, especialmente no topo desta; face dorsal dos membros igual ao corpo; face anterior dos membros inteiramente lisa; face posterior das coxas, bem como toda a região ventral do corpo bem granulosa.

Coloração (vivos): Dorso creme, cinza ou bruneo (sem máculas); face anterior e posterior das coxas amarelo-citrino com pequenas manchas transversais escuras.

Coloração (alcool): Coloração de fundo variando do creme ao bruneo, com toda a parte da cabeça anterior aos olhos sempre mais escura; às vezes uma barra reta, mais escura, interpalpebral; flancos às vezes mais escuros que o dorso, formando como que uma barra dorsal clara; região ventral alvadia ao creme-palha; femur transfaciado de marron, dorsalmente; tibia transfaciada só na face ventral; região dorsal do corpo, às vezes com máculas irregulares marrons; os exemplares de intensidade de coloração media dão, dorsalmente (corpo e membros) a nitida impressão de um fino reticulo; pés finamente manchados de marron na face dorsal.

Girinos: Numa *Bromeliaceae* onde capturamos adultos, obtivemos dois girinos de mais ou menos 16mm de comprimento, cuja formula das laminas dentarias, apesar de mal conservados, pudemos determinar como sendo $\frac{1}{\frac{1-1}{3}}$

Voz: Kriii — Kriii — Kriii — em tudo semelhante à voz da *Hyla perpusilla* da Ilha da Queimada Grande.

Habitat: Vivem em *Bromeliaceae* terrestres, em cujas coleções dagua realizam o ciclo evolutivo.

Distribuição geografica: Ilha dos Alcatrazes, São Paulo, Brasil.

Nota: A *Hyla* aqui tratada, bem como *Hyla perpusilla* da Ilha da Queimada Grande, objeto de outra publicação, faz parte do complexo *Catharinae*.
Não tentamos a determinação da *Hyla* em questão pelas razões seguintes: a) a Dra. Bertha Lutz, do Museu Nacional, está fazendo um estudo de conjunto desse grupo e promete para breve a publicação de uma monografia; b) o nosso material foi, por aquela distinta anfibiologista, examinado e a quem cedemos alguns exemplares. Nada, pois, mais logico que esperar os seus resultados.

RESUMO

E' relatado o encontro, na Ilha dos Alcatrazes, São Paulo, Brasil, de *Leptodactylus nanus* e de *Hyla* sp. (do grupo *Catharinae*).
São oferecidas descrições e fotografias, bem como alguns dados sobre a biologia de ambas as especies.
Após o estudo do abundante material obtido chegou-se à conclusão que *L. trivittatus* Lutz, representa apenas fase de colorido de *L. nanus*.

ABSTRACT

In the Alcatrazes Island, State of São Paulo, Brazil, were caught *L. nanus* and *Hyla* sp. (of the complex *Catharinae*).
Descriptions, photos, as well as some biological data of both species are given.

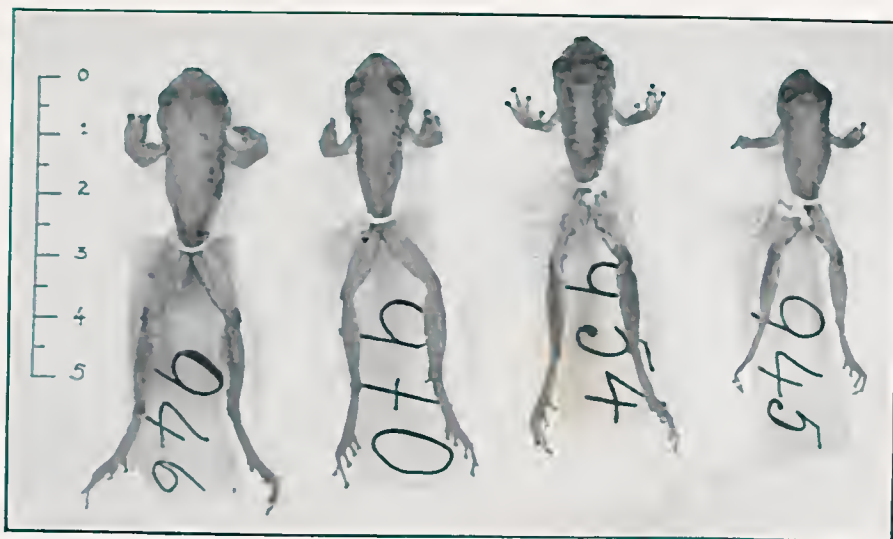
BIBLIOGRAFIA

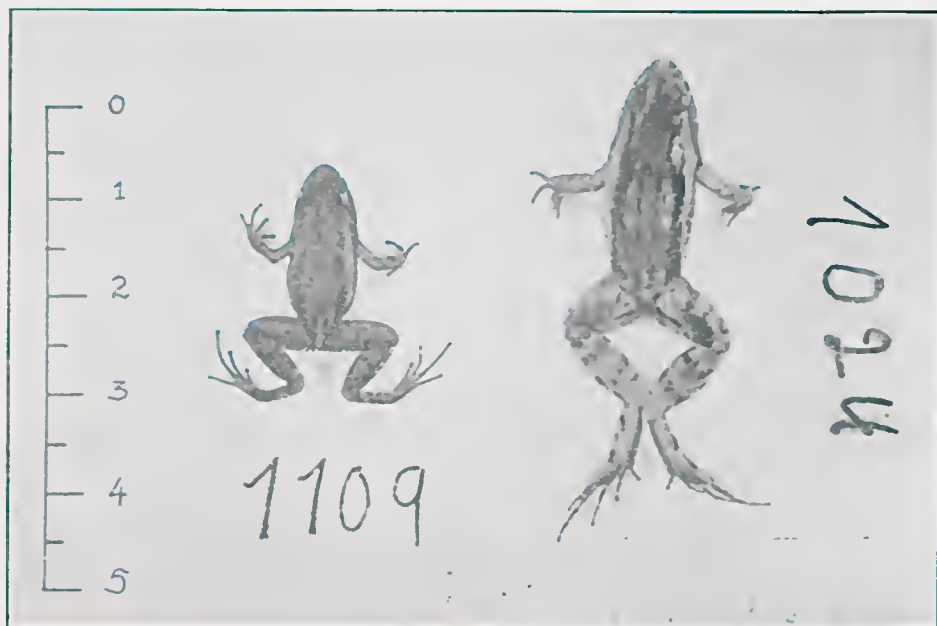
1. *Lutz, A.* — Manguinhos, 10 de março de 1926.
2. *Lutz, B.* — Copeia 4: 242, 1947.

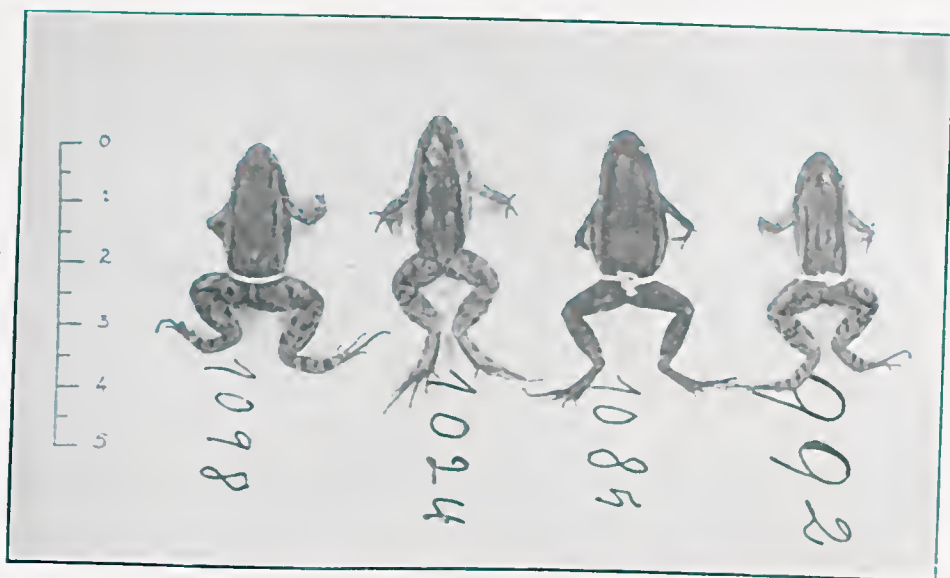
Medidas (m m)

Nome: HYLA sp. N.o	963	952	9,53	948	945	961	954	947	949	946
Compr. do corpo:	19,4	21,8	22,0	23,0	23,0	26,4	27,3	28,6	30,7	31,0
Compr. da cabeça	8,0	8,6	8,7	8,8	9,0	10,4	10,4	11,5	12,5	11,6
Largura da cabeça	7,8	8,5	8,5	8,8	8,9	10,2	10,1	10,8	11,7	11,8
Compr. do femur:	9,4	9,3	9,4	9,7	9,6	12,4	11,4	13,6	13,8	13,8
Compr. da tibia	10,8	11,9	11,8	12,0	11,1	16,2	14,4	16,6	16,6	15,6
Compr. do pé à ponta do 4.o artelho:	13,7	14,2	14,4	14,2	14,4	18,8	18,4	21,0	20,7	20,6
Menor distancia entre as choanas:	1,8	1,8	1,9	1,9	1,9	2,6	2,3	2,8	2,7	2,8
Espaço entre as narinas:	1,6	1,8	1,7	2,0	1,9	1,9	2,2	1,8	2,3	2,4
Dist. bord. ant. narina á ponta do focinho:	0,7	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Dist. bordo post. cal. carp. a ponta 3.o dedo:	5,1	5,3	5,4	5,7	5,6	6,6	6,4	7,0	7,5	7,0
Dist. bordo post. narina ao bord. ant. timpano:	5,8	6,1	6,3	6,8	7,0	8,0	8,3	8,6	8,9	8,5
Altura do timpano (transv.):	1,1	1,1	1,2	1,4	1,5	1,6	1,6	1,7	1,8	2,0
Larg. do timpano (longitud.):	1,1	1,1	1,2	1,4	1,4	1,6	1,6	1,6	1,8	1,8
Diametro ocular (longitud.):	2,4	2,6	2,6	3,0	3,3	3,2	3,5	3,4	4,1	4,0
Dist. bordo ant. olho à ponta do focinho:	3,5	4,0	4,1	4,0	4,0	4,8	5,8	5,8	5,7	5,1
Espaço interorbital anterior:	4,1	4,8	4,9	4,8	4,6	6,0	6,2	6,4	6,6	6,4

Nome: LEPTODACTYLUS NANUS N.o	1075	1103	1077	1048	1031	1101	994	991	1034	1085
Compr. do corpo:	19,8	23,3	23,3	24,5	25,5	25,5	25,6	27,0	28,0	28.0
Compr. da cabeça:	7,0	8,4	8,8	9,0	8,5	9,1	8,6	9,4	9,6	9,1
Largura da cabeça:	6,6	7,8	8,4	8,7	8,3	9,0	8,3	9,0	9,0	9,1
Compr. do femur:	7,4	9,3	9,4	9,9	8,9	10,8	9,9	10,6	11,0	11,0
Compr. da tibia:	8,6	10,4	11,0	11,4	11,1	11,8	11,4	11,8	11,9	12,0
Compr. do pé à ponta do 4.o artelho:	14.0	17,7	17,7	17,8	18,1	19,2	18,3	18,8	19,0	18,4
Menor distancia entre as choanas:	1,7	2,0	2,0	2,0	2,2	2,3	2,3	2,2	2,3	2,3
Espaço entre as narinas:	1,7	2,0	2,0	2,0	2,2	1,9	2,3	2,2	2.3	2,3
Dist. bordo ant. narina á ponta do focinho:	0,9	1,2	1 2	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2	1,3	1,4
Dist. bordo post. cal. carp. á ponta 3.o dedo:	4,2	5,0	5,4	5,3	5,3	5,3	5,2	5 4	5,5	5,1
Dist. bordo post. narina ao bord. ant. timpano:	4,3	5,0	5,0	5,1	5,1	5,4	5,2	5,7	5.9	5,9
Altura do timpano (transv.):	1,0	1,2	1,3	1,5	1,3	1,6	1,4	1,6	1,6	1,6
Larg. do timpano (longitud.):	1,0	1,2	1,3	1,3	1,3	1,6	1,4	1,6	1,6	1,6
Diametro ocular (longitud.):	2.2	2,8	3,0	3,0	2,8	2,9	2,8	3,3	3,1	3,1
Dist. bordo ant. olho à ponta do focinho:	3,0	3,6	3,6	3,7	3,6	3,8	3,5	3,7	3,8	3,9
Espaço interorbital anterior:	3,6	4,2	4,3	4,4	4,3	4,5	4,2	4,1	4,5	4,5

Nome: LEPTODACTYLUS NANUS N.o	1017	1050	1043	1080	1073	1026	1030	993	1019	1000
Compr. do corpo:	19,0	20,5	24,0	21,5	25,0	25,8	25,8	26,0	27,5	28,0
Compr. da cabeça:	6.7	7,0	8,3	8,3	8,7	9.0	9,1	9,2	9,4	9,5
Largura da cabeça:	6,7	7,0	8,0	8,2	8,0	8,1	8,6	8,8	8,7	9,0
Compr. do femur:	7,5	8,0	9,6	9,1	9,6	10,2	10,1	10,5	10,6	10,6
Compr. da tibia:	9,0	9,4	11,2	10,9	11,1	11,1	11,6	11,8	12,6	12,0
Compr. do pé a ponta do 4.o artelho:	14.8	15,0	19,0	18,0	18,0	18,9	18,0	19,6	18,6	19,2
Menor distancia entre as choanas:	1,4	1,5	1,7	1,8	2,0	2,1	2,4	2,3	2,5	2,5
Espaço entre as narinas:	1,5	1,6	1,8	1,8	2,0	2,1	2,2	2,3	2,1	2,4
Dist. bordo ant. narina a ponta do focinho:	0,8	1,0	1,2	1,3	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Dist. bord. post. cal. carp. a ponta do 3.o dedo:	3,7	4,0	5,1	4,9	5,1	5'2	5,4	5,5	5,4	5,1
Dist. bordo post. narina ao bord. ant. timpano:	4.2	4,5	5,1	5,1	5,1	5,2	5,4	5,6	5,6	5,6
Altura do timpano (transv.):	0,8	4,0	1,2	1,2	1,2	1,3	1,4	1,6	1,6	1,6
Largura do timpano (longitud.):	0,8	1,0	1,2	1,2	1,2	1,4	1,4	1,6	1,6	1,6
Diametro ocular (longitud.):	2,2	2,3	2,4	2,4	2,6	2,7	2,8	2,0	2,9	3,0
Dist. bordo ant. olho a ponta do focinho:	2,6	3,0	3,6	3'7	3,6	3,7	3,8	3,8	3,6	3,8
Espaço interorbital anterior:	3,2	3,4	3,9	4,0	4,2	4,3	4,4	4,5	4,7	4,5

Hyla sp.
Adultos.

Leptodactylus nanus
Os 3 primeiros exemplares acinzelados e o 4.º negroide. Todos com máculas pouco visíveis, a) no texto.

Leptodactylus nanus
1.109 com barras avermelhadas
1.204 com barras claras

Leptodactylus nanus
Notar que o 1.º e 4.º exemplares possuem barras laterais avermelhadas cu roseas d) no texto.

Leptodactylus nanus
Exemplares iguais aos a) ou b) possuindo, toldavia, barras laterais claras, c) no texto

Leptodactylus nanus
Exemplares semelhantes aos referidos como a), porém, notavelmente mais claros e com máculas bem visíveis, b) no texto.

Mem. Inst. Butantan,
22:75-126, Nov.º 1950.

ESTUDOS ELECTROFORÉTICOS

1.º — MÉTODOS E TÉCNICA

POR GÜNTER HÖXTER & RAUL MUNGIOLI
(da Secção de Fisico-química do Instituto Butantan)

CONTEÚDO

I) Introdução.

II) Teoria do movimento de partículas coloidais num campo eléctrico.

III) Método electroforético.
- a) Descrição geral do aparelho.
- b) Instalações mecânicas.
- c) Ligações eléctricas.
- d) Sistema óptico.
  - 1 — Formação das imagens.
  - 2 — Método de Longsworth.
  - 3 — Método de Lamm.
  - 4 — Método de Philpot-Svensson.
  - 5 — Ajustamento do sistema óptico.
  - 6 — Diferença entre lâmina e fenda.

IV) Técnica do experimento electroforético.
- a) Preparo do material.
- b) Diálise.
- c) Preparo da célula.
- d) Formação do perfil.

V) Análise das observações electroforéticas.
- a) Análise dos traçados.
- b) Análise geométrica.
- c) Método de Tiselius e Kabat.
- d) Método de Pedersen.
- e) Método de Labhart.
- f) Método de Wiedemann.
- g) Nosso método.
- h) Cálculo da mobilidade aparente.

VI) Resumo da parte técnica.

VII) Referências bibliográficas.

Entregue para publicação em 14 de novembro de 1949.

I) INTRODUÇÃO

Uma das mais valiosas contribuições da físico-química aos estudos biológicos é a electroforese. No sentido largo da palavra, electroforese significa o movimento de partículas carregadas num campo eléctrico. A técnica electroforética, desenvolvida pelos trabalhos de Tiselius e Longsworth, permite a observação destas migrações, a determinação das mobilidades, a separação de substâncias que caminham com velocidades diferentes, e a avaliação das quantidades relativas de cada espécie de uma tal mistura. Como as forças eléctricas do campo exercem apenas uma ação muito leve sobre as propriedades eléctricas da superfície de cada partícula, o método é aplicável por excelência ao estudo dos biocoloides e especialmente das proteinas.

Um dos princípios biológicos do ser vivo é a sua adaptabilidade ás modificações do ambiente; na molécula proteica, este fato reflete-se pela resposta anfotérica: em meio ácido, a proteina reage como uma substância básica, formando cations (de carga positiva); em meio alcalino, ela se transforma em anions (de carga negativa). Estas modificações processam-se instantaneamente por mudanças do pH externo, sem influir na estrutura interna da molécula.

Entre a forma positiva e a negativa da proteina existe um estado neutro onde a carga total é zero. O pH correspondente a esta neutralidade é o ponto iso-eléctrico, onde a mobilidade também é zero. Num pH abaixo deste ponto, a proteina caminha para o pólo negativo, acima dele a migração se processa em direção ao pólo positivo. Quanto mais afastado do ponto iso-eléctrico, tanto maior será a velocidade de migração numa ou noutra direção.

O ponto iso-eléctrico é uma característica estrutural da cada proteina e um dos critérios de identidade físico-química. Numa mistura de proteinas cujos pontos iso-eléctricos não coincidem, temos a possibilidade de separar as proteinas pela diferença das mobilidades. O seguinte quadro exemplifica estas diferenças para a mistura das proteinas plasmáticas humanas:

Fracção proteica	Mobilidade a pH 8,6	Ponto iso-eléctrico
albumina	5,94	4,6
globulina α_1	5,07	4,7 (?)
globulina α_2	4,08	4,8
globulina β	2,83	5,2
fibrinogênio	2,14	5,4
globulina γ	1,02	6,4

O tratamento das proteinas neste processo é tão suave que mesmo substâncias instáveis como fibrinogênio ou enzimas podem ser submetidas á investigação electroforética. As nossas pesquisas abrangem o estudo das proprtedades electroforéticas das seguintes substâncias:

a) Proteinas plasmáticas de homem, cão e cavalo, e suas modificações nos envenenamentos por peçonhas.
b) Proteinas do soro de cavalos e suas modificações no decurso da imunização contra vários antígenos.
c) Proteinas plasmáticas humanas e suas modificações por doenças.
d) Proteinas plasmáticas normais dos animais de laboratório.
e) Soros terapêuticos submetidos a vários processos de purificação e concentração.
f) Venenos de cobras, escorpiões, aranhas e abelhas.

Como não encontramos nenhuma descrição da electroforese em idioma português, iniciamos a nossa publicação com um resumo da teoria geral do movimento de partículas carregadas, dando em seguida todos os detalhes da nossa técnica que se baseia nas recomendações apresentadas pelos trabalhos de Tiselius, de Longsworth, e de Wiedemann.

II) TEORIA DO MOVIMENTO DE PARTÍCULAS COLOIDAIS NUM CAMPO ELÉCTRICO

Uma partícula de carga eléctrica constante vai se movimentar num campo eléctrico contínuo em direção ao pólo de carga oposta. Quando a partícula for de tamanho pequeno, como os ions por exemplo, o fenómeno da migração no campo eléctrico recebe o nome de iontoforese. Neste caso, e para partículas esféricas que se movimentam sem interferência pelas outras partículas, como por exemplo em diluição infinita, a velocidade (v) é uma função da carga (q) e do

raio (r) da partícula, da fôrça (H) do campo eléctrico, e da viscosidade (η) do meio onde a partícula caminha.

$$v = \frac{q\ H}{6\pi r\ \eta} \qquad \text{(Fórmula 1.)}$$

Para partículas de forma desconhecida é melhor usar a seguinte fórmula:

$$v = \frac{q\ H\ D}{k\ T} \qquad \text{(Fórmula 2.)}$$

onde D = constante de difusão da partícula naquele meio
T = temperatura absoluta (.° Kelvin)
k = constante de Boltzmann.

Estas fórmulas só podem ser aplicadas quando cada partícula se movimenta independente de outras partículas, num ambiente isento de outras cargas. A mobilidade (u) que significa a velocidade da partícula num campo eléctrico de fôrça H=1, é

$$u = \frac{v}{H} = \frac{q\ D}{k\ T} \qquad \text{(Fórmula 3.)}$$

A electroforese difere da iontoforese pelo fato de se caracterizar por uma mobilidade menor do que aquela calculada pela fórmula 3. A partícula coloidal cujo movimento observamos na electroforese exerce uma atração sobre os dipolos do solvente e sobre os ions de carga oposta que provêm da dissociação das substâncias tampões e de outros sais presentes. A núvem destes ions que circundam a partícula carregada vai se movimentar na direção oposta e deste maneira diminuir a mobilidade, dependendo este efeito ralentador da fôrma e do tamanho da partícula coloidal que forma o núcleo, e da concentração e carga — mas não da natureza química — destes ions na núvem (Gouy). Quando a concentração dos outros ions é grande em comparação com a concentração do coloide nuclear, podemos calcular a fôrça iônica (μ) pela fórmula de Lewis

(Fórmula 4.)

$$\mu = \tfrac{1}{2} \Sigma c_i z_i^2$$

onde c_i = concentração de cada espécie de ions
z_i = valência de cada espécie de ions

Nas determinações electroforéticas é preciso indicar sempre a fôrça iônica (μ) do meio usado, pois o valor numérico da mobilidade depende deste fator. O efeito ralentador desta núvem iônica sobre a mobilidade da partícula central pode ser calculada (segundo Gorin) à base das teorias de Helmholtz e de Freundlich e von Smoluchowski. Assim, o sistema "coloide + nuvem iônica" pode ser considerado um condensador com uma camada formada pelo coloide central e outra pelos ions de carga oposta. A distância entre estas camadas é conhecida como a grossura da camada eléctrica dupla (Helmholtz); ela é infinita em diluição infinita e diminui com o aumento da concentração iônica quando a casca iônica se aproxima cada vez mais do coloide nuclear. Segundo Freundlich e von Smoluchwski, entretanto, esta casca iônica que forma a placa externa do condensador não tem limites exteriores abruptos, mas continua estendendo-se através do líquido circundante. No lugar do condensador de Helmholtz podemos agora colocar uma partícula carregada que se circunda de um campo eléctrico. O potencial deste campo é constituido pelo potencial electrocinético (ζ) que na ausência de sais é uma função da carga (q), do raio (r) da partícula (presupostamente esférica) e da constante di-eléctrica (ε) do solvente.

$$\zeta = \frac{q}{\varepsilon \, r} \qquad \text{(Fórmula 5.)}$$

Combinando agora as fórmulas 1. e 3. e substituindo a carga (q) pelo valor da fórmula 5. vamos obter a mobilidade electroforética

$$u = \frac{v}{H} = \frac{q}{6 \, \pi \, r \, \eta} = \frac{\zeta \, \varepsilon}{6 \, \pi \, \eta} \qquad \text{(Fórmula 6.)}$$

Esta fórmula corresponde àquela derivada por Debye e Hückel para uma partícula esférica isolada de outros ions. Helmholtz calculou a seguinte equação.

$$u = \frac{\zeta \, \varepsilon}{4 \, \pi \, \eta} \qquad \text{(Fórmula 7.)}$$

para uma partícula cilindrica com o eixo na direção do campo eléctrico. Podemos generalizar estas fórmulas escrevendo

$$u = \frac{\zeta \varepsilon}{C \eta} \qquad \text{(Fórmula 8.)}$$

onde (C) é uma constante que depende da forma da partícula, mas não do seu tamanho. $C = 4 \pi$ para cilíndros, e $C = 6 \pi$ para esferas. O potencial electrocinético depende somente da natureza da superficie da partícula, e a mobilidade fica assim independente do seu tamanho. A presença da núvem iônica vai modificar esta mobilidade por um fator que depende da grossura (d) da camada eléctrica dupla, ou, em outras palavras, da distância do centro eléctrico desta núvem. Podemos calcular o potencial electrocinético resultante (ζ^R) pela fórmula

$$\zeta_R = \frac{q}{\varepsilon r} - \frac{q}{\varepsilon (r+d)} = \frac{q}{\varepsilon r} \; \frac{d}{(r+d)} \qquad \text{(Fórmula 9.)}$$

Combinando agora

$$u = \frac{q}{C r \eta} \quad \text{com } q = \zeta_R \; \varepsilon \; r \left(\frac{r}{d} + 1 \right) \text{ da fórmula 9.}$$

vamos obter

$$u = \frac{\zeta_R \; \varepsilon}{C \eta} \left(1 + \frac{r}{d} \right) \qquad \text{(Fórmula 10.)}$$

Quando (d) fica grande, em soluções diluidas, a mobilidade se aproxima da fórmula 8. Na derivação de Debye e Hückel

$$u = \frac{\zeta \varepsilon}{6 \pi \eta} (1 + \varkappa r) \qquad \text{(Fórmula 11.)}$$

relacionando ($\varkappa$) com (d) pela fórmula

$$d = \frac{1}{\varkappa} \times \frac{\varkappa r}{1 + \varkappa r} \qquad \text{(Fórmula 12.)}$$

Para partículas grandes onde $\varkappa r \gg 1$ a grossura (d) fica independente do tamanho (r), um fato verificado experimentalmente por Abramson e por Mooney que observaram que a mobilidade num campo eléctrico de partículas esféricas de

uma emulsão cresce com um aumento do raio até atingir um valor limite acima do qual a mobilidade se torna independente do raio. A adição de sais nestas emulsões tende a igualar a mobilidade para partículas de todas as dimensões; o mesmo acontece quando as gotículas da emulsão são cobertas com um filme de proteina. O valor de (d) pode ser calculado pela fórmula.

$$d^2 = \frac{\varepsilon\, k\, T}{8\, \pi\, N\, e^2 \mu} \qquad \text{(Fórmula 13.)}$$

onde N = número de Avogadro
e = carga do eléctron
μ = fôrça iônica

Para o valor de ($\varkappa$) da fórmula de Debye e Hückel existe uma expressão idêntica:

$$\varkappa^2 = \frac{8\, \pi\, N\, e^2 \mu}{\varepsilon\, k\, T} \qquad \text{(Fórmula 14.)}$$

Entretanto, a fórmula 14. só pode ser aplicada no caso da dissociação total. Assim, para soluções aquosas de sais monovalentes, a O.º C. e com (ε) igual á constante di-eléctrica da água

$$\frac{1}{\varkappa} = \frac{3{,}06}{\sqrt{c}} \times 10^{-8}\ \text{cm} \qquad \text{onde } c = \text{concentração molar.}$$

Para partículas esféricas podemos calcular o raio (r) pela fórmula

$$r = \frac{k\, T}{6\, \pi\, \eta\, D} \qquad \text{(Fórmula 15.)}$$

Um fator que ainda não foi considerado é a solvação das partículas pela aproximação e imobilização parcial de dipolos do solvente. Este fator vai influir sobre a medida da viscosidade (η) e diminui com a redução do potencial electro-

cinético (ζ), como por exemplo ao aproximar-se do ponto iso-eléctrico, ou com um aumento da força iônica (μ) quando há substituição dos dipolos pelos ions de carga única.

Pode-se deduzir que a mobilidade electroforética depende de inúmeros fatores e que as fórmulas citadas servem apenas de base para a interpretação qualitativa das relações entre a constituição da superfície e o tamanho da partícula com o seu movimento num campo eléctrico. O único dado quantitativo que nós podemos obter com facilidades pelas observações electroforéticas é a mobilidade aparente (u_A).

$$u_A = u - u_R$$

onde (u_R) é o efeito ralentador da nuvem de ions e dipolos que circundam a partícula. Este efeito deve desaparecer no ponto iso-eléctrico, e as determinações da mobilidade na região iso-eléctrica darão provavelmente valores que se aproximam mais da fórmula calculada. Entretanto, a carga (q) é muito pequena na região iso-eléctrica e o movimento é tão lento que as determinações podem ficar prejudicadas pelo tempo demorado de observação.

III) MÉTODO ELECTROFORÉTICO

a) *Descrição geral do aparelho*

O equipamento electroforético consiste essencialmente de uma célula transparente, colocada entre dois pólos de um campo elétrico, e de um sistema óptico para a observação do movimento das substâncias na célula. Esta célula tem a forma de um tubo de "U" e é de corte rectangular para permitir a observação e facilitar a eliminação do calor de Joule produzido pela passagem da corrente na solução. Várias secções que deslizam sobre faces esmerilhadas subdividem a célula permitindo a separação e isolamento das várias partes. Estamos trabalhando com 4 jogos de células:

I — Célula micro de 2 ml, para uso analítico.

II — Célula semimicro de 11 ml, para uso analítico e preparativo.

III — Célula semimacro de 75 ml, para uso preparativo.

IV — Célula macro de 150 ml, para uso preparativo.

Figura 1
Célula micro

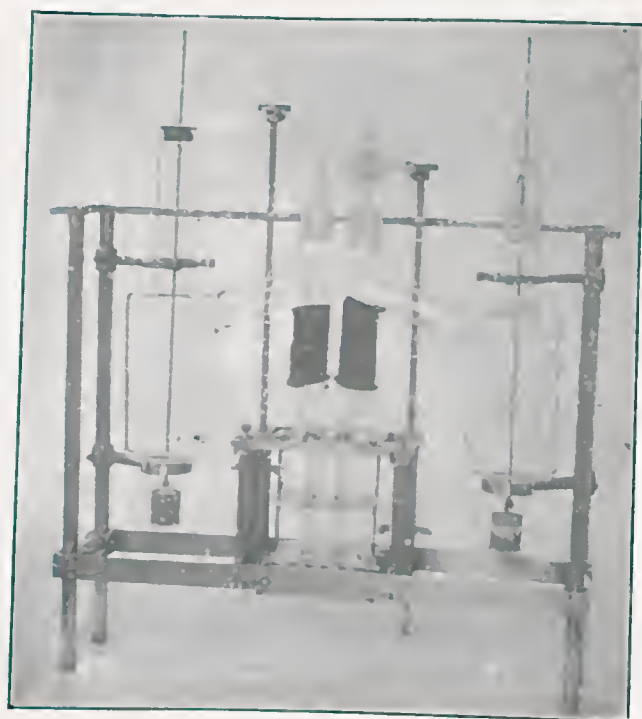



Figura 2
Célula semimicro

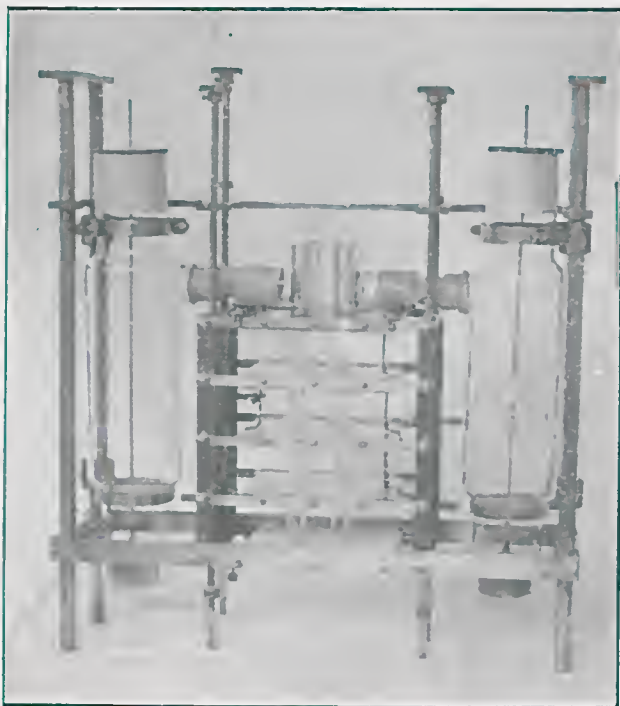



FIGURA 3
Célula macro

Os vasos grandes, de cada lado da célula, contêm os electrodios de prata e cloreto de prata numa solução de cloreto de potássio para evitar a polarização. O nosso aparelho (fabrícado pela Klett Manufacturing Co. New York, U.S.A.) inclui ainda:

1) O banco óptico.

2) A lâmpada de mercúrio.

3) O tanque para o banho de temperatura constante.

4) A lente "Schlieren".

5) O conjunto frigorífico, com serpentina de resfriamento, agitador, termo-regulador de mercúrio, e relé electrônico.

6) A seringa sincronizada.

7) A máquina fotográfica, com objetiva, fecho da objetiva, lâmina horizontal, lâmina inclinada, diafragmas, tubo óptico, lente cilíndrica, vidro fôsco, e chassis.

b) *Instalações mecânicas*

O aparelho é montado sobre dois trilhos de aço de 16 cm, com um comprimento de 6 m e uma distância de 20 cm entre os trilhos. A fonte de luz é uma lâmpada de 100 watt, tipo H 4, com um arco de mercurio de 1,5 x 25 mm. A lente "Schlieren" de 10 cm tem uma distância focal de 90 cm e forma o lado externo de uma das janelas do termostato, os outros lados sendo constituidos por vidros planos que não devem apresentar defeitos ópticos. Estas janelas têm que ser duplas para evitar seu embaçamento pela deposição da humidade atmosférica. Conserva-se o espaço entre as partes da janela isento de vapor de agua pela passagem de ar seco ou por meio de vácuo. Para evitar o enbaçamento por fora pode-se usar um jacto de ar quente que impinge sobre as faces externas das janelas. Frizamos a importância deste ponto, pois é imprescindivel para a obtenção dos perfis que as lentes e janelas estejam perfeitamente claras, transparentes e limpidas.

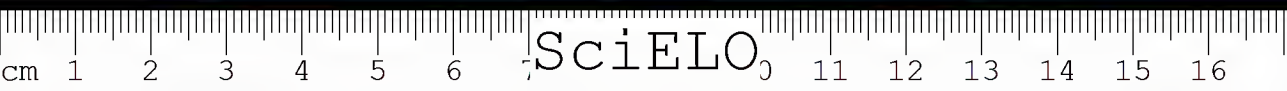
A lâmina horizontal para observações pelo método de Longsworth consiste numa chapa de metal que se pode mover verticalmente por meio de uma engrenagem cônica e um eixo que passa em baixo da máquina fotográfica até outra engrenagem que liga com um motor ao lado esquerdo do vidro fôsco. O mesmo motor inflige um movimento horizontal ao plano do vidro fosco e da chapa fotográfica, sincronizando assim os dois movimentos. A objetiva da máquina fotográfica é uma lente de 5 cm com uma distância focal de 90 cm. Em frente da objetiva há um fecho de sector, movido por um motor sincronizado, e um disco com 6 aberturas diferentes que, segundo Longsworth, tem a vantagem de eliminar todos os raios luminosos que não fazem parte da faixa principal. No método de Philpot-Svensson usa-se sempre a abertura circular. A lente cilindrica que tem uma distância focal de 40 cm encontra-se dentro do tubo óptico e costuma ser usada com a curvatura virada para o lado do vidro fosco; a sua posição é ajustável na direção do eixo óptico da máquina fotográfica para permitir a focalização, e ela pode girar em redor de um eixo vertical na sua extremidade esquerda, ligado a um parafuso externo, para ser retirado do caminho óptico nas observações pelos metodos de Longsworth e de Lamm. A lâmina

inclinada, a fenda inclinada e o fio inclinado, para uso nas observações com a lente cilíndrica, são postas bem em frente ao fecho da objetiva.

FIGURA 4
Lâmina inclinada

FIGURA 5
Fenda inclinada

FIGURA 6
Fio inclinado

Figura 7
Vista geral do aparelho do lado da fotografia.

Figura 8
Vista geral do aparelho do lado da iluminação

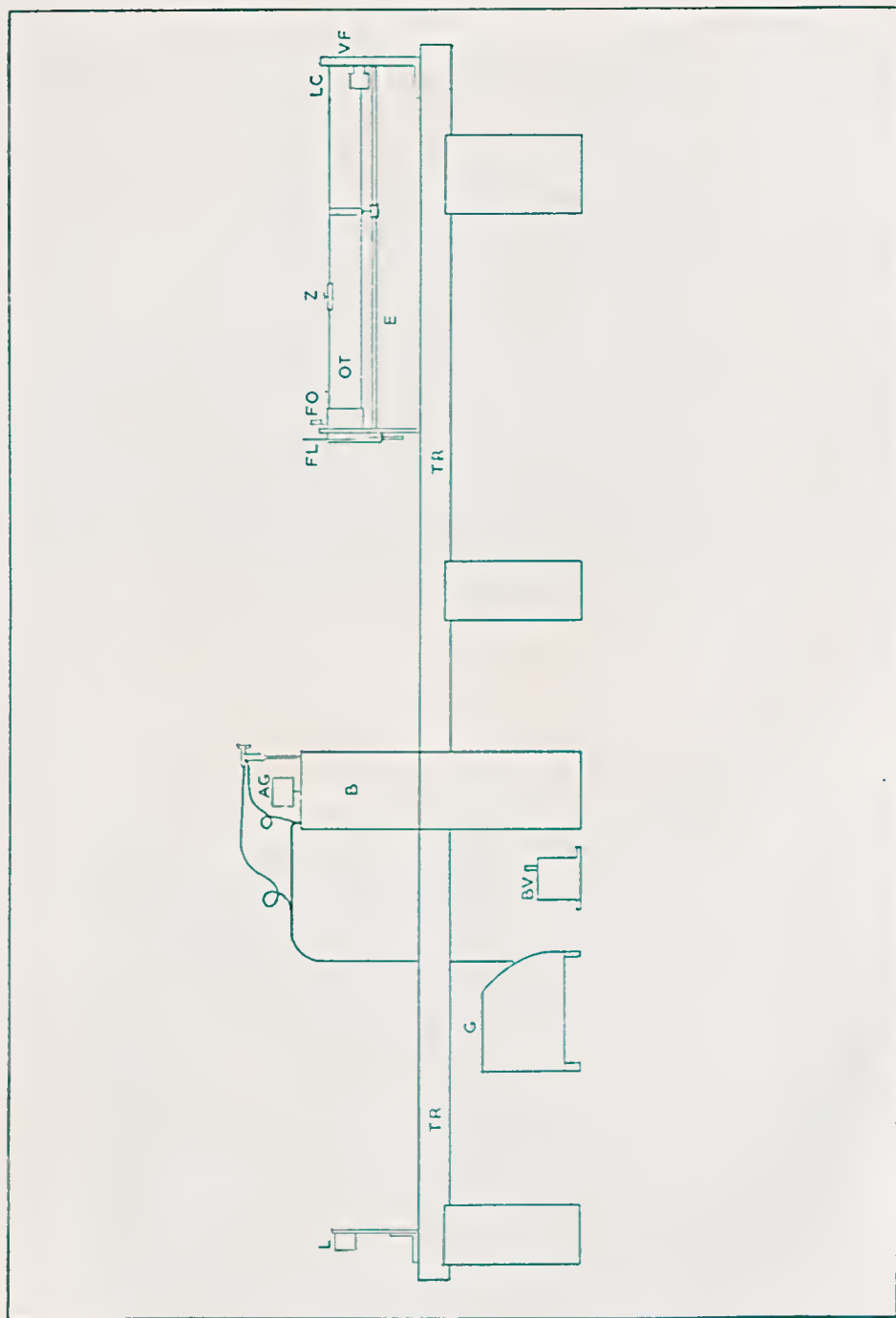



FIGURA 9 ESCALA 1:40
Esquêma do aparelho de electroforese

c) *Ligações eléctricas*

As instalações eléctricas consistem no transformador (TL) que alimenta a lâmpada (L) de mercúrio, na bomba de vácuo (BV) para as janelas do banho, no termoregulador e relé (TG) para a máquina frigorífica (G), no agitador (AG) do banho, no motor da seringa sincronizada (SS), no motor do fecho da objetiva (FO), no motor da lâmina e chapa móvel (LC), no relógio eléctrico (R) e no retificador da corrente (RC) que fornece a corrente contínua para a célula através de uma série de resistências e medidores que servem para regular e medir a voltagem e a amperagem do campo eléctrico. Todas as chaves, interruptores, reguladores e instrumentos estão reunidos num quadro de contrôle.

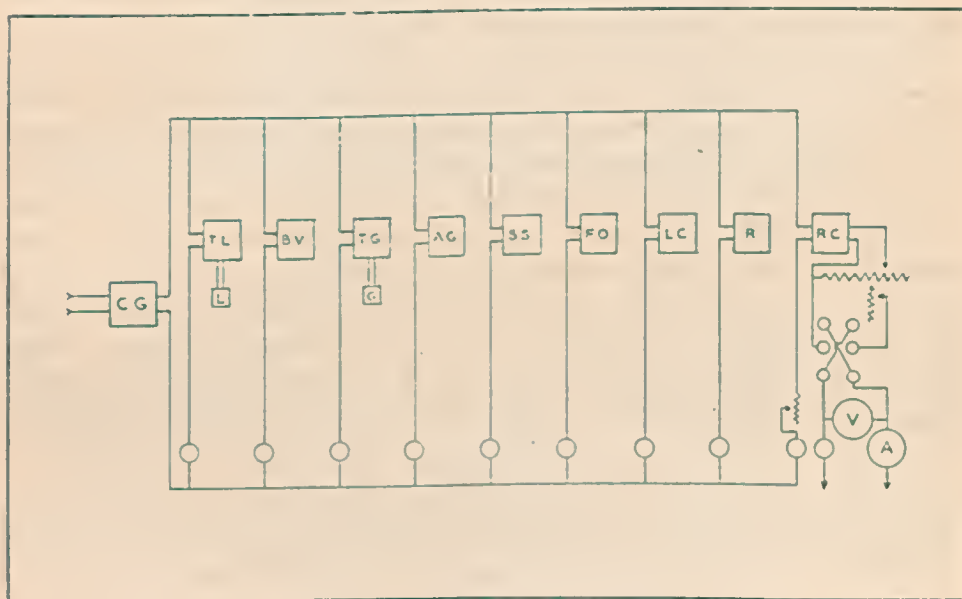



FIGURA 10
Esquêma das ligações eléctricas

d) *Sistema óptico*

1 - Formação das imagens.

Quando se trata de observar a migração de um colóide opaco ou colorido, o sistema óptico consiste apenas numa fonte de luz e num condensador que reproduz a imagem da célula electroforética sem aberrações no plano do vidro fosco. O caminho percorrido pela imagem da divisa no vidro fosco num determinado tempo, dividido pelo fator do aumento do sistema óptico, representa a velocidade daquela divisa na célula electroforética.

Quando se trata, entretanto, de soluções incolores como por exemplo de soluções de proteinas plasmáticas, a observação do movimento das divisas torna-se mais complicada. Svedberg e Scott utilizaram a absorpção dos raios de ultra-violeta pelas soluções proteicas, trabalhando com células e lentes de quartzo; este processo foi mais tarde suplantado pelos métodos de Tiselius, Longsworth, Philpot, Svensson e Lamm que usaram as ondas do espectro visível, aproveitando a diferença de indice de refração que existe entre duas soluções proteicas diferentes. O método de Tiselius que utilizou dois princípios de Foucault e a sua aplicação no processo das "Schlieren" de Toepler baseia-se na seguinte observação:

Imaginemos uma solução proteica em contacto com uma solução diferente e que tenha um indice de refração menor. Raios paralelos vão atravessar as duas soluções sem desvios, mas um raio que passa na divisa entre as duas soluções vai sofrer um desvio para baixo, para o lado da solução opticamente mais densa. Si houver agora um diafragma que deixe passar apenas a faixa central e elimine todos os raios desviados, a imagem da célula que contém as duas soluções vai apresentar uma sombra no lugar da divisa onde falta o raio que sofreu o desvio. Este método permite assim a observação da divisa entre duas soluções de diferentes indices de refração pela sombra obtida na fotografia da célula através de um diafragma apropriado. O sistema óptico consiste assim numa fonte de luz visível (L) que através do primeiro diafragma (S) ilumina a lente de "Schlieren" (LS). A luz atravessa depois a célula electroforética (CE) e focaliza-se no plano de um segundo diafragma (FL), entrando na máquina fotográfica pela objetiva (O) e formando a imagem no vidro fosco (VF).

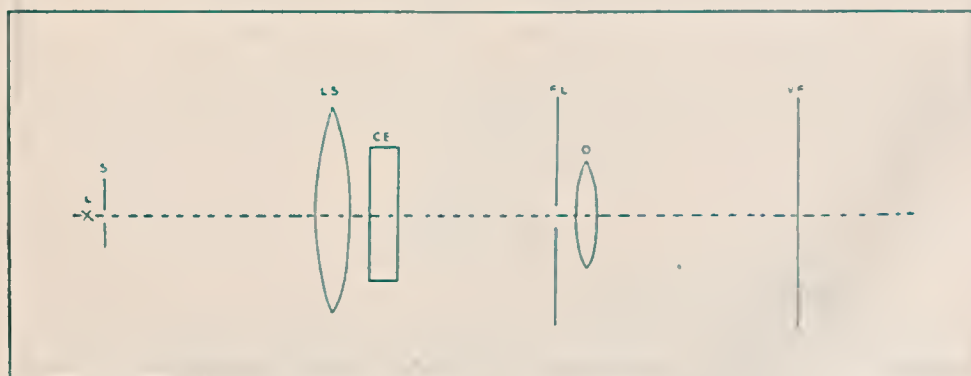



FIGURA 11

Quando a célula contém uma solução transparente e ópticamente homogénea, toda luz que passa pela célula atravessa o segundo diafragma e forma

uma imagem completamente iluminada da parte central da célula. Mas si a célula contiver dois liquidos de indices de refração diferentes que se tocam na linha indicada (i), a luz que entra na divisa (superficie de contacto) entre as duas soluções vai sofrer um desvio para o lado do meio opticamente mais denso. Como este se encontra geralmente em baixo, o desvio vai ser para baixo e os raios de luz que sofreram esta refração vão cair fora da segunda fenda. O lugar da divisa vai então ser marcado por uma faixa escura na imagem iluminada da célula sobre o vidro fosco. O desvio que a luz sofre depende da grossura da célula (a) e da variação do indice de refração (n) com a altura (h) da camada de liquido na célula. Medindo o desvio vertical (δ) no plano da segunda fenda, temos

$$\delta = a\, b \frac{dn}{dh} \qquad \text{(Fórmula 16.)}$$

onde (b) é a distância entre a célula e a segunda fenda. Esta expressão limita a aplicabilidade do método, e a precisão das observações está na dependência da grossura da célula, da distância da fenda (em função da distância focal da lente "Schlieren"), e da diferença dos indices de refração das duas soluções.

As condições são escolhidas de tal maneira que as duas soluções tem a mesma composição e concentração de sais e que a única diferença entre elas é que a solução de baixo contém a proteina ou mistura de proteinas que estão sendo investigadas, emquanto que a solução de cima não contém proteina. A diferença dos indices de refração corre assim unicamente por conta da proteina e é diretamente proporcional á concentração proteica. Desta maneira, o desvio (δ) pode servir de medida para a concentração proteica na divisa. Entretanto, a divisa não forma um único plano geométrico mas consiste numa região onde a composição varia gradativamente de uma solução para a outra. O indice de refração nesta região acompanha estas mudanças contínuas conforme a altura na célula; a relação dn/dh vai assim variar de zero até um máximo voltando novamente ao zero, para cada divisa.

Como todos os raios que sofrem um desvio em virtude de refrações na zona de contacto entre duas soluções vão passar em baixo da faixa normal de luz que atravessa a segunda fenda sem desvio, podemos substituir esta fenda por uma lâmina afiada. Conforme a posição desta lâmina vamos eliminar uma parte dos raios desviados e obter como imagem uma faixa escura mais ou menos larga. Com a lâmina fóra do campo toda a luz cai sobre o vidro fosco dando uma imagem completa da célula sem sombras. Levantando a lâmina até cortar o raio de maior desvio, vamos obter na imagem uma linha preta no

lugar da divisa entre as duas soluções. Esta linha preta vai se alargar com a aproximação da lâmina até a faixa normal da luz. A sombra que assim aparece na imagem recebeu o nome de faixa "Schlieren" — nome adaptado do trabalho original de Toepler e conservado em todas as linguas e indicando uma interrupção da continuidade óptica. A largura da faixa "Schlieren" está assim na dependência da posição da lâmina. Resumindo todas estas imagens successivas vamos obter uma figura geométrica que no caso ideal representa a área da curva de Gauss.

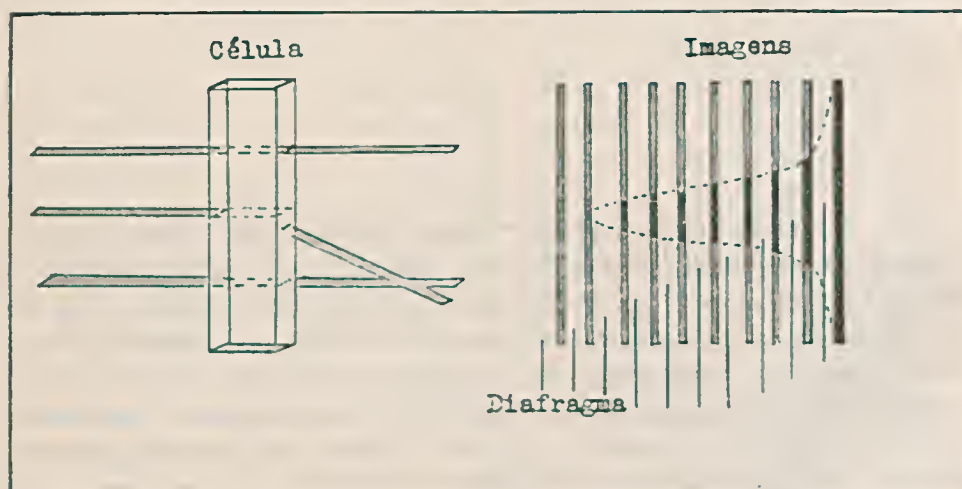



Figura 12

Por razões práticas costuma-se reproduzir estas imagens viradas por um ângulo de 90°, da maneira que a maior extensão lateral representa a altura da curva.

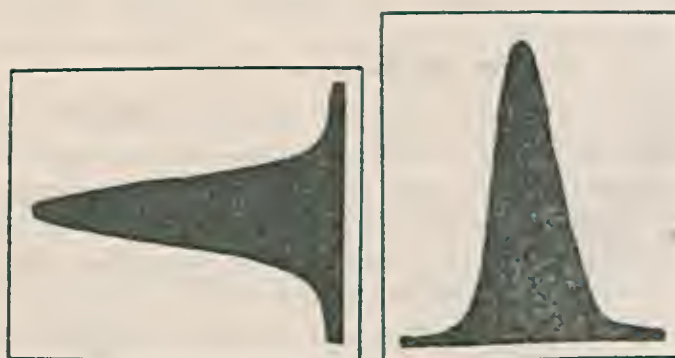



Figura 13

Esta altura depende da maior refração sofrida que por sua vez é uma função da concentração proteica. A maneira de tirar conclusões numéricas da forma desta curva, ou de qualquer outra representação dos desvios que a luz sofre na sua passagem através da célula, caracteriza os métodos mais usados na interpretação das observações electroforéticas.

2 — Método "Schlieren scanning" de Longsworth. (Exploração da interrupção de continuidade óptica.

Em combinação com o levantamento vertical da lâmina, Longsworth usa um movimento horizontal simultâneo da chapa fotográfica, colocada no lugar do vidro fosco, que vai somando as várias imagens successivas. A área assim obtida representa a soma de todos os desvios sofridos pela luz na região das duas soluções da célula. A relação entre o desvio e o índice de refração na divisa das duas soluções foi dada na fórmula 16. A área total é proporcional á soma de todos estes desvios:

$$\int \delta\, dh = \frac{a\ b}{g} \int \frac{dn}{dh}\, dh = \frac{a\ b}{g} \left(n_2 - n_1 \right) \quad \text{(Fórmula 17.)}$$

onde (g) é a constante de proporcionalidade.

$$g = \frac{1}{j\ m} \quad \text{sendo}$$

j = relação do movimento da chapa com o movimento da lâmina
m = fator de aumento da máquina fotográfica

A diferença de índice de refração ($n_2 - n_1$) é proporcional á concentração (c) da substância (proteina) dissolvida na solução no fundo da célula. Si (K) = incremento específico de refração, a saber a diferença de índice de refração por unidade de substância dissolvida, nos temos

$$c\ K = n_2 - n_1$$

Substituindo este valor na fórmula 17. vamos obter

$$\int \delta\, dh = \frac{a\ b}{g}\, c\ K$$

$$c = \frac{g}{a\ b\ K} \int \delta\, dh \quad \text{(Fórmula 18.)}$$

Quando temos uma mistura de proteinas, os vários componentes vão caminhar com velocidades diferentes, conforme as cargas eléctricas dos coloides no pH da experiência. Vamos tomar como exemplo o caso de 3 proteinas de pontos isoeléctricos diferentes, mas todos abaixo do pH da experiência, de tal maneira que as proteinas tem cargas negativas e vão caminhar em direção ao anódio.

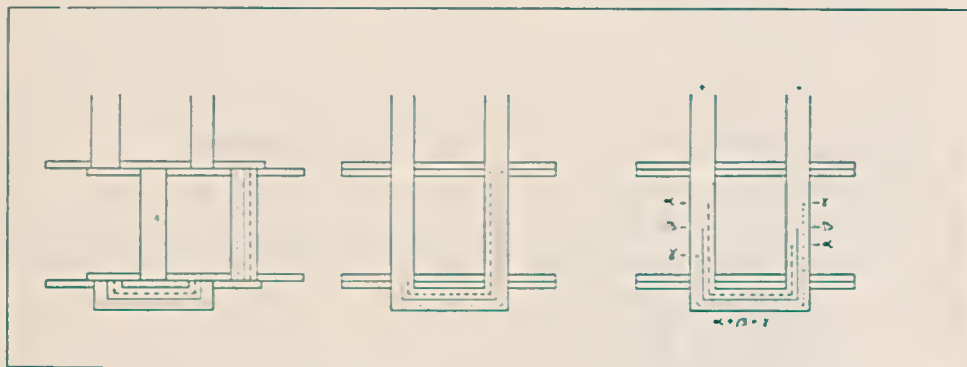



FIGURA 14

Si as cargas destas proteinas estão na relação $\alpha > \beta > \gamma$ vamos obter tres curvas, com tres picos que correspondem ás tres divisas entre as soluções $(\alpha + \beta + \gamma)]$ contra $(\alpha + \beta)$, $(\alpha + \beta)$ contra (α), e (α) contra o tampão. No lado catódico do tubo, onde as proteinas vão fugir do catódio, existem as mesmas condições e as mesmas imagens. Para diferenciar as imagens, chamamos o lado anódico onde as proteinas caminham para cima, de lado ascendente (lado A), e o outro lado, de lado descendente (lado D). As duas imagens, entretanto, não são estritamente idênticas, pois si no lado ascendente as proteinas estão entrando no tampão, no lado descendente as proteinas vão caminhar para dentro da solução proteica que tem uma viscosidade e concentração iónica maior que o tampão, em virtude da contribuição dos ions proteicos. Na preparação da solução proteica para a electroforese, a proteina é colocada em diálise contra a solução tampão até estabelecimento de equilibrio iónico entre as duas soluções. As concentrações electroliticas das duas soluções, entretanto, nunca são idênticas em virtude do equilibrio de Donnan. Com estas diferenças de concentração aparecem outras divisas que não são provocadas por proteinas, e que devem ser eliminadas ou afastadas das divisas proteicas pela correção das concentrações electroliticas ou pela escolha de condições nas quais a diferença da velocidade de migração das divisas é bastante grande para permitir a separação entre as divisas proteicas e as outras.

O afastamento lateral, na direção da migração, de cada pico de curva, da posição original da divisa inicial entre as duas soluções indica a mobilidade, e a área em baixo da curva mede a concentração daquela proteina que provocou a formação da respectiva divisa.

O método de Longsworth é simples e rápido e pode ser aplicado para medir pequenas diferenças de concentração, pois a altura dos picos da curva pode variar conforme a velocidade relativa entre a lâmina e a chapa.

3 — Método da escala de Lamm.

Neste método não há fenda, nem lâmina, mas unicamente uma escala transparente que se coloca perto da célula no caminho dos raios que vêm da fonte de luz. A escala é fotografada através da célula, e as suas divisões vão sofrer desvios em virtude das diferentes refrações na célula. Comparando as divisões desviadas, como aparecem na fotografia, com as posições originais, regularmente espaçadas, da escala, temos uma medida da refração em cada ponto da célula. Um gráfico destes desvios contra a altura da célula forma uma curva que representa a posição das divisas e as concentrações das substâncias que provocaram estas diferenças.

O método de Lamm fornece resultados quantitativos muito exatos e serve para observar divisas bem fracas onde as diferenças de concentração são pequenas, mas o trabalho de avaliar as curvas ponto por ponto, a partir dos desvios sofridos pelas divisões da escala, é extremamente penoso e exige muito tempo. O maior inconveniente deste método, e também do de Longsworth, é o fato que a migração e a formação das divisas não podem ser observadas diretamente e que é preciso justapor várias fotografias, tiradas de tempo em tempo, para poder apreciar o progresso da separação das fracções. Esta dificuldade foi completamente eliminada pelo método de Philpot-Svensson.

4 — Método de Philpot-Svensson.

O processo da formação das imagens neste método é puramente óptico, permitindo a observação direta e continua do perfil electroforético sem a necessidade de movimentar lâminas ou chapas fotográficas. Ele se baseia numa combinação das "Schlieren" de Toepler com um processo de Thouvert que Philpot tinha usado para observação das divisas que se formam na ultracentrifuga. Svensson adaptou o método de Philpot ás observações electroforéticas com a seguinte modificação: A imagem de Philpot representa uma área preta num fundo branco, emquanto Svensson obtem uma linha branca num fundo preto. Há ainda outra modificação que fornece uma linha preta num fundo branco. As respectivas vantagens destas modificações vão ser apontadas mais tarde. O

princípio geral do método é o seguinte: A faixa de luz depois de atravessar a célula, passa por uma fenda inclinada, colocada no lugar da lâmina horizontal de Longsworth, continuando pela objetiva da máquina fotográfica e por uma lente cilíndrica de eixo vertical que se encontra entre a objetiva e o vidro fosco.

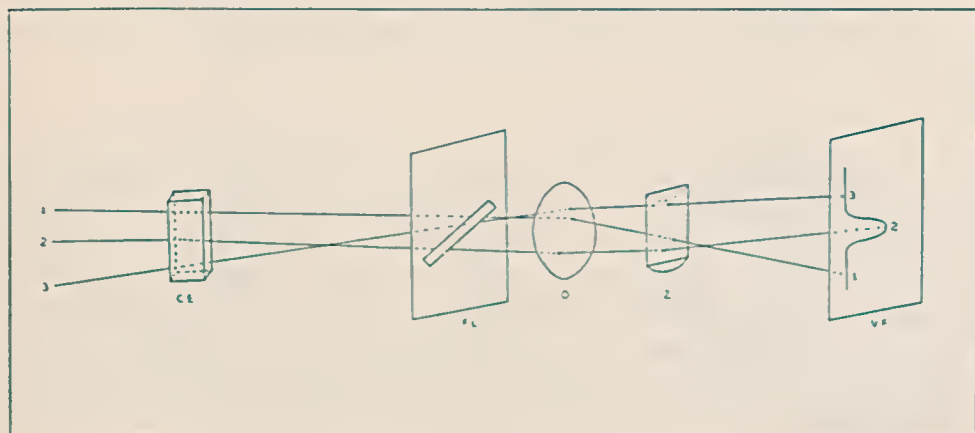



FIGURA 15

Os raios que vão atravessar a célula nos lugares onde não existem divisas, não sofrem desvios e vão formar uma linha vertical no vidro fosco. Porém os raios que são desviados pela refração nas divisas vão atravessar a fenda inclinada num ponto mais baixo e lateralmente deslocado, passando pela lente cilíndrica num ponto mais afastado do eixo e sofrendo porisso uma inflexão maior, caindo á direita da linha dos raios normais da imagem no vidro fosco. Quanto maior a refração na célula, tanto mais a imagem do raio desviado se afastará da linha da base dos raios normais não desviados. A imagem representa assim uma linha base e uma curva que corresponde á curva obtida pelos outros processos. Os cálculos são os mesmos como antes. O desvio de cada ponto é

$$\delta = a\ b\ \frac{dn}{dh}$$

e a área incluida entre a base e a curva de Gauss que representa as variações da concentração na divisa é

$$\int \delta\ dh = \frac{a\ b}{g}\ (\ n_2 - n_1\ )$$

A concentração de proteina que provocou esta diferença dos indices de refração é

$$c = \frac{g}{a\ b\ K} \int \delta\ dh$$

A constante de proporcionalidade (g) que no método de Longsworth depende das velocidades da lâmina e da chapa fotográfica, torna-se aqui uma função do ângulo (θ) da fenda inclinada e do fator do aumento da máquina fotográfica que inclui agora a lente cilíndrica.

$$g = \frac{1}{m\ tg\ \theta}$$

$$c = \frac{1}{m\ a\ b\ K\ tg\ \theta} \int \delta\ dh \qquad \text{(Fórmula 19.)}$$

Em geral, não há necessidade de determinar as constantes (m,a,b,) do aparelho porque as concentrações relativas dos componentes electroforéticos interessam mais que as quantidades absolutas; estas podem então ser calculadas facilmente a partir da concentração proteica total que se determina por dosagens químicas, de preferência pelo Micro-Kjeldahl. O incremento específico (K) é praticamente igual para todas as fracções proteicas do plasma, com exceção das lipo-proteinas. O valor médio de (K) para plasma humano é de 0,00185 por grama de proteina em cada 100 ml de solução para a linha D do espectro visível.

A fenda inclinada tem uma forma especial, inventada por Svensson para formar linhas finas e nítidas. A abertura da fenda é variável entre 0 — 5 mm, como também o ângulo (θ) da fenda com a vertical.

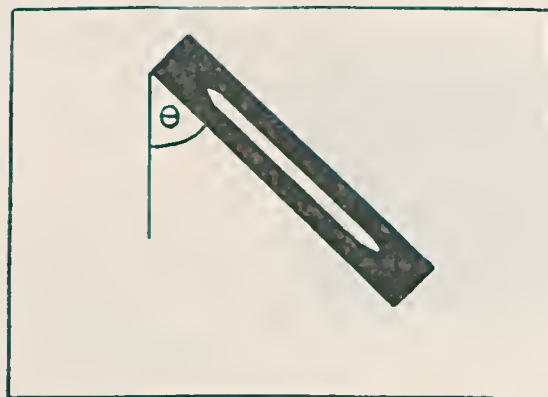



FIGURA 16

Colocando uma lâmina inclinada no lugar da fenda inclinada de tal maneira que os raios desviados para baixo são interceptados por esta lâmina, nós vamos obter como imagem uma área escura cujos contornos correspondem á linha branca obtida pela fenda. Colocando um fio inclinado no lugar da lâmina, a imagem vai ser uma linha preta num fundo claro. Estas variações encontram aplicações em alguns casos, mas o resultado é independente do método de obtenção do perfil electroforético. O mais recomendado é o método da fenda inclinada segundo Svensson que permite obter fotografias nítidas. Não há necessidade de usar chapas ou filmes, uma tira de papel fotográfico comum (Kodabromide) é suficiente, pois bastam alguns segundos de exposição durante os quais não há movimento perceptível do perfil electroforético.

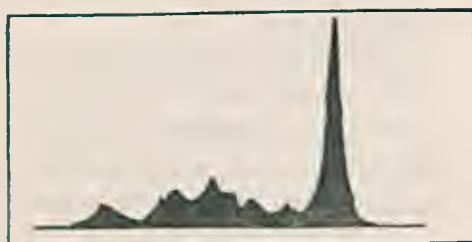
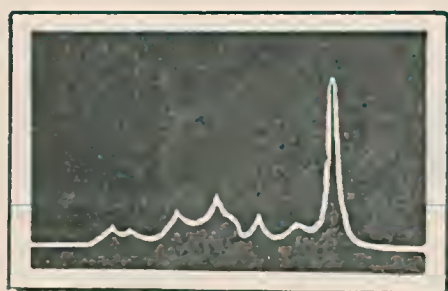
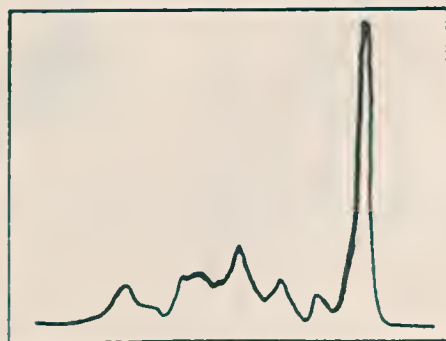
Lâmina horizontal

Lâmina inclinada

Fenda inclinada

Fio inclinado

Figura 17

5 — Ajustamento do sistema óptico.

O sistema óptico deve ser construido do melhor material, com lentes bem corrigidas e com um mínimo de aberrações. O ajustamento do conjunto é muito importante e deve ser féito com todo o cuidado possível, obedecendo as seguintes recomendações gerais:

1) Retirar a célula do banho. Ajustar a posição da fonte de luz e da primeira fenda até formar uma imagem nítida de 25 mm de largura, no mínimo, no plano da segunda fenda.
2) Recolocar a célula, retirar a lente cilíndrica e a fenda inclinada. Ajustar a posição da objetiva da máquina fotográfica até formar uma imagem nítida da parte central da célula no vidro fosco. Recolocar a lente cilíndrica.
3) Colocar uma lâmina ou fenda horizontal no plano da fenda inclinada e ajustar a posição da lente cilíndrica até obter uma imagem nítida no vidro fosco.
4) Substituir a lâmina horizontal pela fenda inclinada e observar que a imagem forme uma linha vertical nítida.
5) Verificar a ausência de aberrações das lentes pelo seguinte processo:

Aberrações horizontais

Com a segunda fenda em posição horizontal e sem a lente cilíndrica, observar a imagem no vidro fosco de uma escala transparente de precisão que se coloca horizontalmente no lugar da célula no banho. As divergências das divisões da escala não devem exceder de 0,04 % em 30 mm.

Aberrações verticais

Com a segunda fenda em posição horizontal e bem aberta, e com a lente cilíndrica no lugar certo, observar a imagem no vidro fosco de uma escala transparente de precisão colocada verticalmente junto da segunda fenda, com as divisões paralelas ao eixo da lente cilíndrica. As divergências das divisões da escala não devem exceder de 0,05 % em 25 mm.

6 — Diferença entre lâmina e fenda.

As imagens formadas pela fenda consistem de uma linha mais ou menos fina cuja grossura depende da abertura da fenda. O centro desta linha é sempre fixo e não depende do tempo de exposição. A lâmina dá como imagem uma área bem nítida, pois não há difração na região da sombra, mas a posição dos contornos desta área varia com o tempo de exposição. Porisso é preferível,

em geral, trabalhar com a imagem linear e reservar a aplicação da lâmina para os casos onde a análise de dois picos muito próximos exige maior nitidez do perfil electroforético.

IV) TÉCNICA DO EXPERIMENTO ELECTROFORÉTICO

a) *Preparo do material*

Para obter uma velocidade electroforética constante é preciso evitar variações dos fatores que influenciam o movimento da proteina: a força do campo eléctrico, a viscosidade do meio, e a carga da proteina. Usamos nesta publicação a proteina como exemplo típico de material que se presta para investigações electroforéticas, mas as mesmas indicações são válidas para trabalhos com outros coloides ou substâncias ionizáveis em geral. A carga da proteina depende do pH e para assegurar a constância do meio, a solução proteica é dialisada contra uma solução tampão até estabelecimento do equilibrio iônico. A mesma solução tampão é depois superposta na célula. O efeito de Donnan vai impedir um equilibrio perfeito, mas este defeito pode ser corrigido parcialmente pela diluição da proteina dialisada com água distilada à razão de 0,05 ml de H_2O para cada ml de solução, ou pelo uso de um tampão 1,08 vezes mais concentrado para o líquido de superposição. O pH da experiência é escolhido de tal maneira que todas as frações da mistura proteica caminham na mesma direção, mas com velocidades diferentes. Para substâncias lábeis, usa-se o pH de maior estabilidade. Pode mesmo haver casos onde se recomendam duas ou mais determinações electroforéticas em valores diferentes de pH. A temperatura da experiência é geralmente entre 2 — 5.° C e tem que ser conservada constante durante toda a electroforese, com variações máximas de 1/10 de °C. Escolha-se de preferência aquela temperatura onde as variações de densidade das soluções são mínimas, para evitar correntes de convecção e mudanças de viscosidade.

A escolha do tampão é muito importante pois a nitidez das curvas depende das condições nas divisas, onde as variações de condutibilidade devem ser insignificantes comparadas á condutibilidade total. Isto significa que a concentração proteica deve ser baixa em relação á concentração iônica do tampão para que não haja grande diferença entre as condutibilidades da solução proteica e da solução tampão. Também, as mobilidades das proteinas e dos ions do tampão não devem ser muito diferentes. Os melhores resultados são obtidos com tampões cujo anion tem peso molecular elevado, para as experiências na região alcalina das proteinas. Para as análises electroforéticas de plasmas e soros usamos um tampão de veronal sódico (di-etil-barbiturato de sódio) decinormal com 0,71 % de oxalato de sódio e ácido di-etil-barbitúrico 0,02 normal, dando um

pH de 8,6 e uma força iônica de 0.1. Não se recomenda uma força iônica maior de 0,2 para evitar uma potência elevada na célula que nunca deve suportar mais de 5 watt. A concentração proteica que pelas razões acima indicadas deve ser a mais baixa possível, fica na dependência do sistema óptico. Para análises de plasma ou soro pelo método de Philpot-Svensson usamos uma concentração em redor de 1,5 % de proteina, diluindo a solução dialisada com solução tampão até obter uma diferença de índice de refração entre proteina e tampão de 0,0030 que indica 1 — 2 % de proteina total na solução. Tendo o cuidado de eliminar ou afastar as falsas divisas que não são provocadas por proteínas, pode-se descobrir 0,05 mg de proteina por ml de solução.

b) *Diálise*

A solução proteica que se deseja submeter á electroforese é colocada num saquinho de papel celofane e dialisada contra um volume 50 vezes maior de solução tampão que se troca por nova solução 6 — 8 vezes durante o tempo de diálise. Na temperatura de 2 — 4°C e sem agitação, a diálise leva 3 — 4 dias, mas por meio de um agitador colocado dentro da proteina, este tempo pode ser encurtado para algumas horas apenas, especialmente quando a diálise se processa em temperatura ambiente. No caso de plasma, a solução tampão deve conter um anticoagulante para evitar a desnaturação do fibrinogênio. O progresso da diálise pode ser acompanhado por medidas conductométricas até que a condutibilidade da solução proteica atinge um valor estável. A solução dialisada é então diluida com mais solução tampão até o teor proteico desejado e centrifugada para ficar límpida.

c) *Preparo da célula*

Damos em seguida a descrição detalhada do processo de enchimento da célula micro, que pode servir de base para trabalhos com as células maiores. É de suma importância que as indicações sejam seguidas com todo o rigor possível, pois o mínimo lapso pode inutilizar todo o material. A célula micro consiste nas seguintes partes: O fundo do tubo de "U", o centro do tubo de "U", a parte superior do tubo de "U", o vaso anódico, e o vaso catódico, com os respectivos electródios. O seguinte esquema indica os passos a seguir:

a) Passar vaselina ou outra graxa semi-sólida nas faces esmerilhadas do tubo de "U" até que cada face deslise com facilidade sobre a face oposta. Retirar o excesso de graxa, evitando a todo custo que se suje o canal interno do tubo de "U".

b) Colocar o fundo e o centro do tubo de "U" no supporte e enchê-los com a solução proteica dialisada, diluida e centrifugada, até alguns milimetros acima da face do fundo.

Figura 18
Colocando o fundo

Figura 19
Colocando o centro

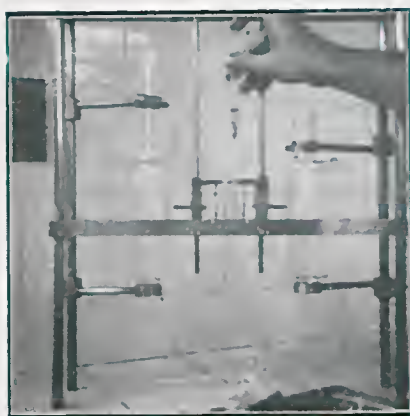



Figura 20
Enchendo c/proteina

c) Deslisar o centro sobre o fundo para a esquerda até fechar os canais da parte do fundo.

d) Retirar por meio de uma seringa com agulha comprida a solução proteica do canal esquerdo da parte central e lavar este canal 3 — 4 vezes com solução tampão até eliminar toda proteina, verificando o desaparecimento da espuma.

Figura 21
Retirando proteina

Figura 22
Lavando com tampão

e) Colocar a parte superior do tubo de "U" em cima da parte central desviada, de tal maneira que os canais coincidem. Encher o canal esquerdo com solução tampão e o canal direito com a solução proteica até alguns milimetros acima das faces esmerilhadas, tendo o cuidado de eliminar todas as bolhas de ar.

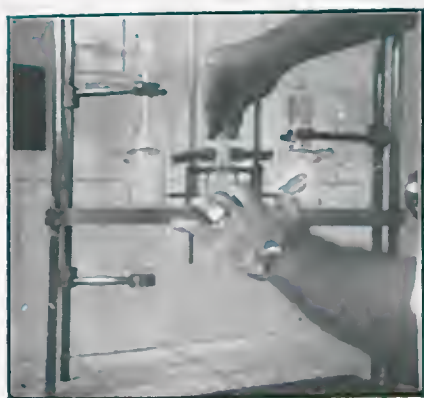



Figura 23
Colocando parte superior

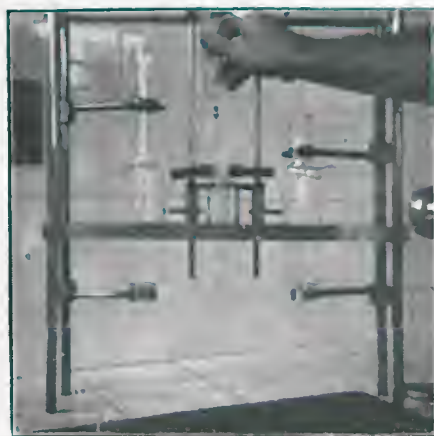



Figura 24
Enchendo com tampão

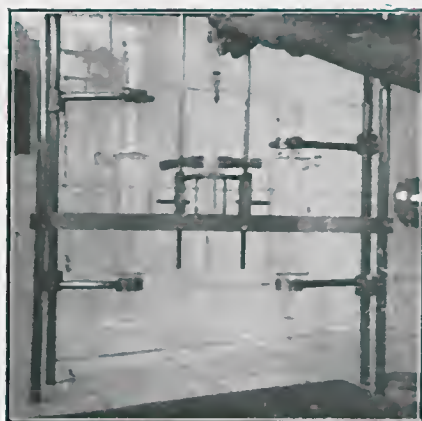



FIGURA 25
Enchendo c/ proteina

f) Firmar o fundo do tubo de "U" por meio de parafusos e a parte central por meio das fivelas e dos pistões móveis. Deslisar a parte superior do tubo de "U" para a direita até isolar a parte central. A parte superior deve ficar bem no centro do supporte com os seus canais verticalmente em cima dos canais do fundo.

g) Lavar o canal direito da parte superior com solução tampão até eliminar todos os traços de proteina. A solução proteica enche agora todo o fundo e o canal direito da parte central do tubo de "U".

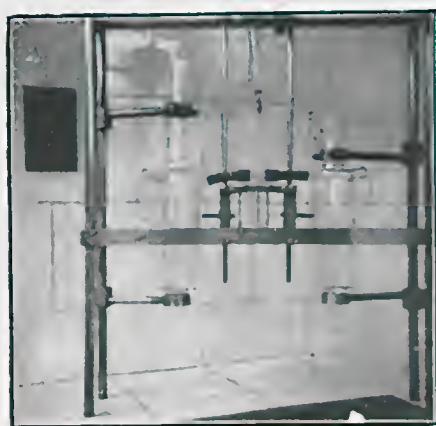



FIGURA 26
Retirando proteina

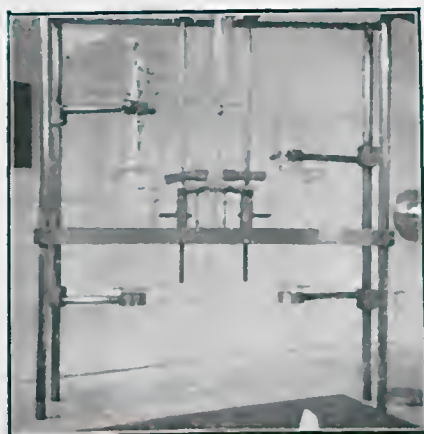



FIGURA 27
Lavando com tampão

h) Firmar a parte superior bem no centro com os parafusos e as molas e colocar os vasos electródicos, ligando seus tubos laterais á cabeça do tubo de "U" por meio de tubos de borracha flexivel.

i) Encher o aparelho com solução tampão até que esta transborde pela parte superior do tubo de "U". Lembramos que tanto a solução proteica como a solução tampão devem estar numa temperatura de 2 — 5°C no momento do seu uso.

FIGURA 28
Enchendo com tampão

j) Inserir os electródios que consistem de folha de prata corrugada e soldada a um tubo de prata. Antes da experiência, os electródios são ativados por electrólise anódica durante alguns minutos, em solução de cloreto de potássio normal, usando um cátodo de carvão. Depois de cada experiência invertem-se

as posições dos electródios; quando a côr escura desaparece, os electródios devem ser ativados novamente.

FIGURA 29
Pondo os electródios

k) Injetar lentamente com cuidado pelos tubos ocos de prata de cada electródio 8 ml de solução normal de cloreto de potássio que ficou conservada na geladeira entre 2 — 5°C.

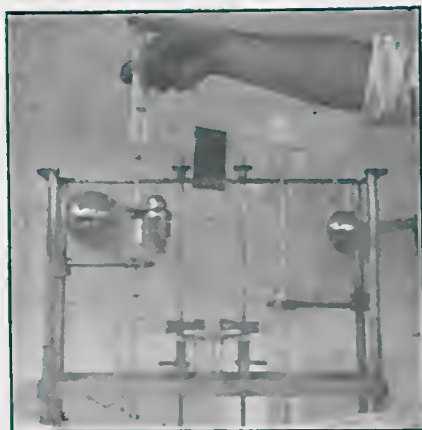



FIGURA 30
Injetando solução de KCl

l) Com um mínimo de agitação colocar o aparelho no banho, previamente esfriado até a temperatura da electroforese. Reajustar o nivel da solução tampão nos dois lados do tubo de "U".

m) Ligar os electródios na fonte de corrente contínua, com o cátodo ou pólo negativo do lado direito (lado da proteina). Esperar 10 — 15 minutos para que o aparelho atinja a temperatura do banho. Acender a lâmpada de mercúrio e focalizar a parte central da célula, sem fendas e sem a lente cilindrica.

n) Deslizar por meio dos pistões, com movimento lento e regular, a parte central do tubo de "U" para o centro até estabelecer contacto com os canais do fundo e da parte superior. É extremamente importante que esta manobra seja executada com um máximo de cuidado para evitar a mistura entre as soluções e o consequente desaparecimento das divisas.

o) Levantar um pouco a lâmina horizontal móvel. Retirar com cuidado pelo canal esquerdo da cabeça uma pequena quantidade de tampão por meio da seringa automática sincronizada, regulando o seu movimento pelo interruptor no quadro de contrôle geral até que as divisas que estavam escondidas atrás das faces esmerilhadas aparecem no vidro fosco. Como as imagens estão invertidas, a divisa ascendente (lado anódico) vai aparecer em cima, e a divisa descendente (lado catódico) em baixo.

FIGURA 31
Retirando o tampão

p) Escolher o lado que se deseja observar e cobrir a imagem do outro lado por meio de uma máscara apropriada, colocada entre a fonte de luz e a lente "Schlieren". Abaixar novamente a lâmina móvel, colocar a fenda inclinada e a lente cilindrica, e verificar que as janelas do banho não estejam emba-

çadas. Ajustar a posição da lâmpada, sem modificar a sua distância, até que a imagem no vidro fosco se mostre uniformemente iluminada.

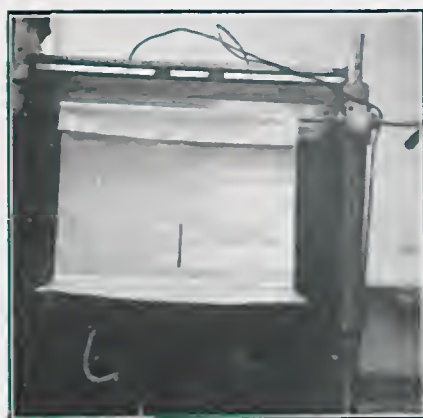



FIGURA 32
Máscara da lente

q) Observar e fotografar a curva inicial da divisa entre tampão e solução proteica.

FIGURA 33
Observando p/vidro fosco

FIGURA 34
Colocando o chassis

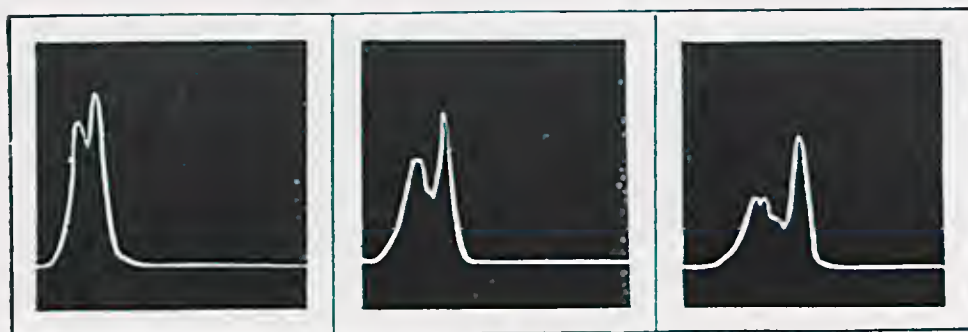
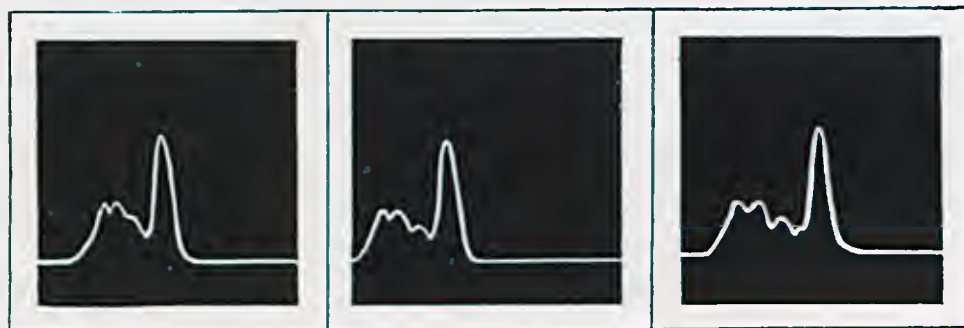
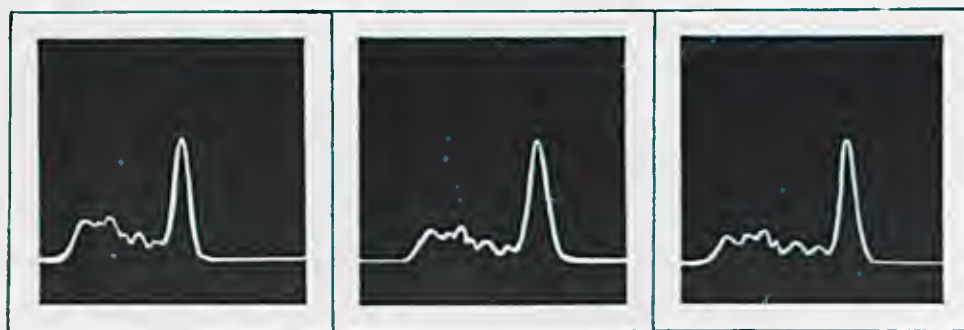
r) Ligar a corrente nos electródios e pôr o relógio em funcionamento.

s) Tirar fotografias do perfil electroforético que se desenvolve e registrar todos os dados importantes num protocolo. (Veja modelo.)

Figura 35
Chassis no lugar

d) *Formação do perfil*

A figura 36 mostra o progresso de uma electroforese de plasma humano, fotografada de 10 em 10 minutos, com a separação dos componentes da mistura proteica que caminham com velocidades diferentes. Entretanto, as curvas não indicam diretamente os componentes, mas apenas a refração da luz nas divisas. Mas como esta refração é proporcional á concentração dos componentes, o perfil indica as suas posições na célula e, pela área em baixo de cada pico da curva, a quantidade de cada fracção.

Figura 36
Divisa inicial

Após 10 minutos — Após 20 minutos — Após 30 minutos

Após 40 minutos — Após 50 minutos — Após 60 minutos

Após 70 minutos — Após 80 minutos — Após 90 minutos

PROTOCÓLO DE ELECTROFORESE

Número.............................. Material...............................
Nome................................ Caso clínico...........................

Diálise

Data do início.......................... Data do fim...........................
Condições............................... Temperatura...........................
pH.................. Tampão.................. Força iônica..................
Volume posto............................ Volume retirado.......................
Volume final após diluição com tampão...
Índice de refração do tampão...................... da solução...............
Condutibilidade do tampão......................... da solução...............

Electroforese

Data................. Início.....horas Fim.....horas.
Distância da divisa inicial: Lado A.................. Lado D.................
Temperatura do banho........... Voltagem........... Amperagem.........

Fotografia

	Minutos	Sistema	Ângulo	Chassis	Dist.	Lado
1)	.....	....	.....	.....	.....	A D
2)	"	"	"	"	"	" A D
3)	"	"	"	"	"	" A D

Medições adicionais

Célula usada............. Área transversal...........................
Voltagem na célula...... Fator de aumento............................
Observações ....
....

Cálculos

Distância Mobilidade Fracção Área Concentração relativa

Responsável............................

V) ANÁLISE DAS OBSERVAÇÕES ELECTROFORÉTICAS

a) *Análise dos traçados*

A análise dos traçados ou perfis electroforéticos fornece dados que permitem calcular a quantidade relativa de cada componente da mistura proteica e à sua mobilidade no campo eléctrico. Quando as condições da electroforese são escolhidas com cuidado, a imagem do lado ascendente deve dar os mesmos valores que aquela do lado descendente. Neste caso, recomenda-se analisar apenas o perfil da lado descendente. Onde não foi possivel eliminar diferenças maiores entre as duas imagens, recomendamos usar o lado ascendente para calcular as áreas, e o lado descendente para a determinação das mobilidades. As discrepâncias entre os dois lados servem para controlar as condições da experiência. As electroforeses que dão menor erro e que são mais reproduziveis são aquelas onde as divergências entre o lado ascendente e o lado descendente foram eliminadas pelo acerto das concentrações relativas das soluções.

Para o mesmo perfil, as constantes (m), (a), (b), e (θ) são iguais, e (K) é praticamente a mesma para todas as frações do plasma; no caso de misturas desconhecidas, entretanto, é preciso determinar o incremento específico da refração por análises químicas e refratométricas de cada fração. Para este fim retira-se uma parte da fração por meio da seringa sincronizada, submetendo o êmbolo da seringa a um movimento lento e uniforme pelo motor.

FIGURA 37
Seringa sincronizada

O líquido da seringa é então analisado por processos químicos para deduzir a concentração da substância (c). Determina-se em seguida a diferença da

refração antes e depois de uma diluição com volume igual de solução tampão. Si esta diferença fôr $\triangle$ n, teremos

$$K = \frac{2}{c} \triangle n$$

(Fórmula 20.)

No caso de plasma e de outros liquidos de refração conhecida é suficiente proceder á análise geométrica do traçado para determinar as concentrações relativas dos componentes.

b) *Análise geométrica*

Esta é a parte mais trabalhosa e mais arbitrária da electroforese. Embora cada divisa forme um pico bem definido no perfil electroforético, a avaliação da área em baixo deste pico encontra dificuldades quando se trata de subdividir a área total do perfil, que corresponde a várias divisas parcialmente superpostas, e designar aquela parte que pertence a cada divisa individual. Devemos lembrar que os contornos desta área individual têm uma forma correspondente á curva de Gauss que tem dois parámetros variáveis: a altura máxima e a largura da base. Teoricamente não há razão para que a curva seja simétrica em torno da altura máxima, mas na prática encontramos quase sempre curvas simétricas. Passamos a indicar os vários métodos que têm sido usados para analisar os perfis.

c) *Método de Tiselius e Kabat*

Estes autores subdividem a área total por ordenadas que passam pelos pontos de inflecção da curva entre os picos. A área assim separada em baixo de cada pico é determinada por planimetria.

Medindo a área total pode-se calcular a porcentagem da cada fracção sobre o total, presumindo que o indice de refração é igual para todas as fracções.

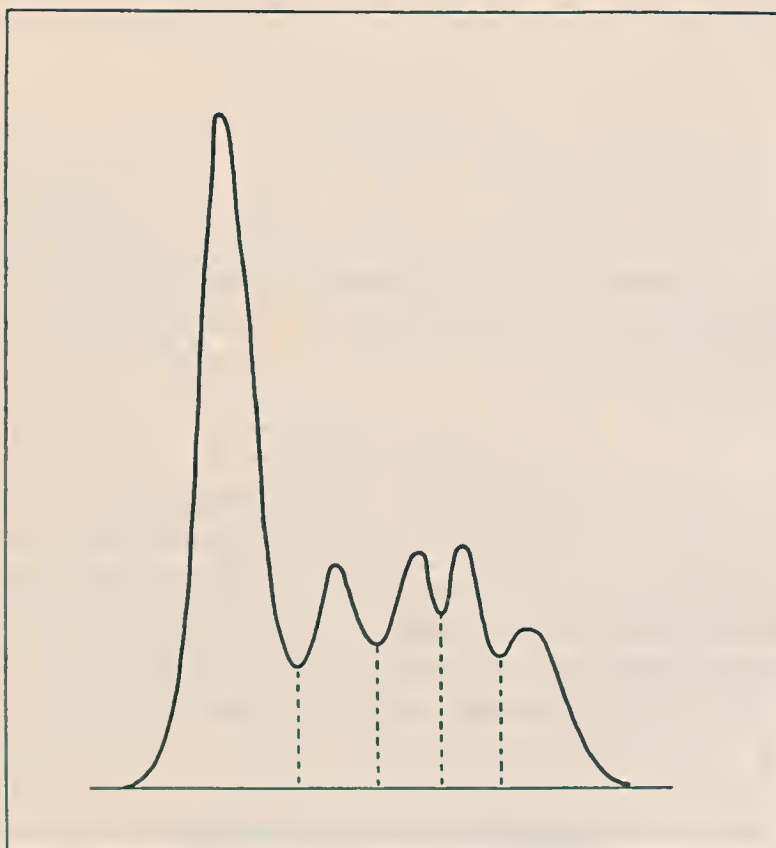



FIGURA 38
Método de Tiselius e Kabat

d) *Método de Pedersen*

A área total é a soma das áreas individuais formadas pelas divisas. Cada divisa individual contribui com o seu perfil electroforético, formado por uma área cujos contornos correspondem á uma curva de Gauss. Pedersen subdivide assim a área total por várias curvas de Gauss simétricas onde as ordenadas máximas coincidem com os picos. A área em baixo de cada curva é determinada por planimetria como antes.

e) *Método de Labhart*

A dificuldade do método de Pedersen reside na incerteza de desenhar uma curva de Gauss quando não se conhecem os parámetros. Labhart inventou um

instrumento que utiliza a superposição óptica de curvas normais de Gauss. Um diapositivo com curvas normais de várias alturas projeta a imagem destas curvas em cima de uma cópia ampliada do perfil electroforético. Por inclinação do diapositivo ao redor de um eixo que coincide com o bisector vertical das curvas pode-se variar a área e a base das curvas até encontrar aquela que melhor se adapta aos contornos do perfil. A altura da curva normal usada e o ângulo de inclinação do diapositivo permitem calcular a área, evitando assim o uso do planímetro.

i) *Método de Wiedemann*

O método de Labhart é trabalhoso e exige um aparelho complicado com lentes sem aberrações, além de se basear na simetria das curvas. Lembrando que se deve esperar pequenas assimetrias nas curvas de difusão de substâncias que não obedecem os critérios de pureza indicados por Lamm, Wiedemann usa um método engenhoso para avaliar as áreas num aparelho projetor que permite variar a ampliação da imagem sem diminuir a nitidez. Um diapositivo contém 16 curvas normais de Gauss, agrupadas em 4 grupos de alturas diferentes e bissectadas verticalmente para permitir a projeção de metades de curvas normais sobre uma cópia ampliada do perfil electroforético. Pela variação do grau de aumento, tanto horizontal como vertical, da imagem fornecida pelo diapositivo pode-se adaptar a curva aos contornos do perfil. A área total que é a soma das duas metades em baixo de cada pico é dada pela fórmula.

$$F = \left(\frac{F}{2_e} + \frac{F}{2_d} \right) s^2$$

(Fórmula 21.)

onde $\frac{F}{2_e}$ indica a área da metade esquerda e $\frac{F}{2_d}$ aquela da metade direita da curva, sendo (s) uma distância marcada no diapositivo e cuja medida permite calcular o aumento da imagem. Os valores de (F) são tirados de uma tabela ou de um gráfico. Este método é o mais preciso entre todos e permite descobrir divisas pequenas que não aparecem no perfil á primeira vista quando o pico de sua fracção não se eleva acima dos contornos da curva. (Veja por exemplo a curva da fração *a*, na Figura 39.). A análise do perfil nas partes onde há super-

posição de duas ou mais curvas é um processo demorado que exige a extrapolação das curvas e a correção repetida de suas ordenadas cuja soma tem que dar a ordenada do perfil total em todos os pontos.

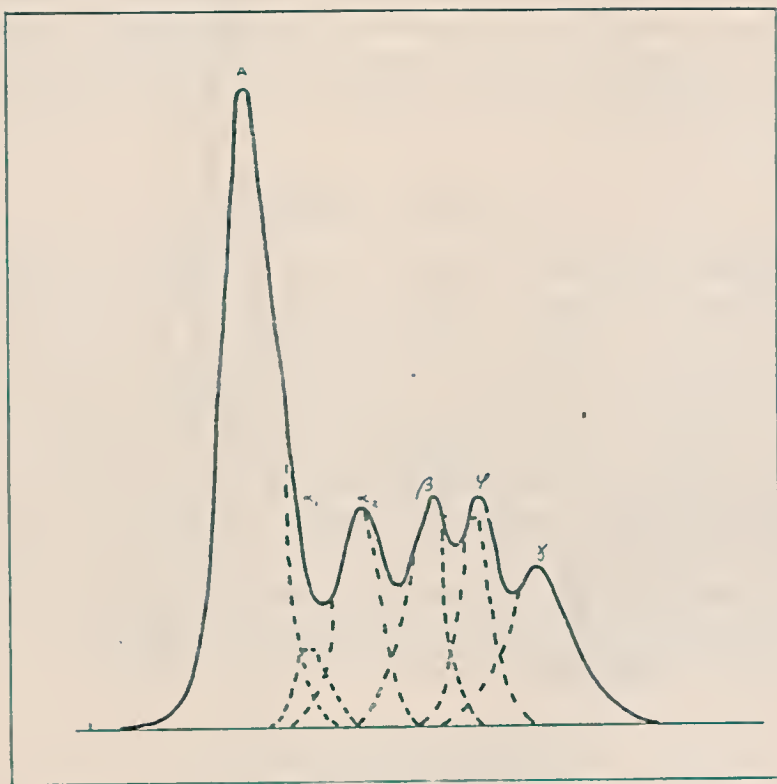



FIGURA 39
Método de Wiedemann

g) *Nosso método*

Para evitar a possibilidade de erros ópticos na análise pelo método de Wiedemann que exige um aparelho projetor com lentes perfeitas, um diapositivo com curvas normais e uma tabela das áreas destas curvas, imaginamos um método puramente geométrico para analisar uma cópia ampliada do perfil electroforético. O nosso processo se baseia na medida de dois parâmetros da curva de Gauss. Examinando a formação das curvas no perfil lembramos que elas representam as mudanças do índice de refração nas divisas. Uma divisa é uma discontinuidade onde duas fases de diferentes composições se tocam. Tomando como exemplo a divisa entre a fracção da albumina e a solução tampão onde a tensão inter-superficial é pequena demais para evitar a difusão das duas

soluções em ambas as direções, podemos ver que as particulas de uma solução não vão formar uma frente única, mas vão se distribuir dentro da outra solução, conforme os caminhos traçados por cada partícula individual. Quanto mais longe da divisa que representa o grosso das partículas, menos partículas da mesma fase vão ser encontradas e menor será a discontinuidade, menor a variação da composição e a diferença entre os índices de refração. Esta distribuição em torno da divisa obedece á probabilidade estatística de encontrar uma partícula da primeira fase num determinado ponto dentro da segunda fase. Traçando um gráfico desta probabilidade, vamos obter uma figura como a seguinte:

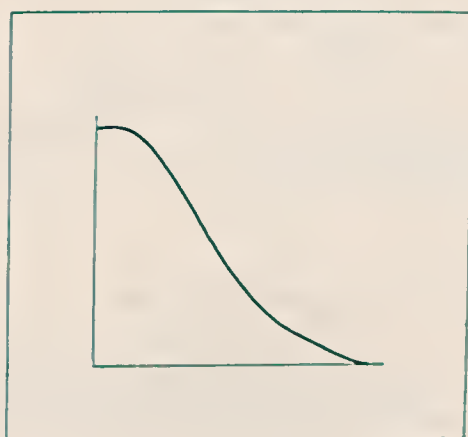



Figura 40

onde a abcissa representa a distância a partir da divisa, e a ordenada o número de partículas (de albumina), em fracção porcentual da concentração na divisa, encontradas naquela distância. O mesmo se aplica ás partículas da fase 2 que avançaram para dentro da fase 1. Si a probabilidade de encontrar uma partícula num determinado ponto fôr (p) e a probabilidade de encontrar nenhuma partícula da mesma fase fôr (q), a fórmula para o desvio padrão σ da distribuição é

$$\sigma = \sqrt{M\ p\ q}$$

onde (M) é o número total de partículas de uma fase dentro da outra. (M) é proporcional á diferença de composição entre as duas fases e indica assim a quantidade da albumina na fase 1, pois a presença da albumina é o único fator que diferencia a fase 2 da fase 1. (M) é tambem proporcional á área em baixo da curva total. A fórmula para a curva de distribuição segundo Gauss é

$$y = \frac{M}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{\frac{-X^2}{2\sigma^2}}$$

onde o coeficiente ($\frac{M}{\sigma \sqrt{2\pi}}$) é igual a ordenada máxima que é a altura (y_m) da curva.

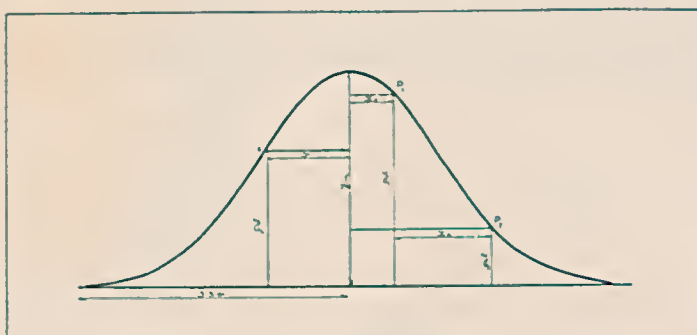



FIGURA 41

Neste caso, (M) é a área em baixo da curva.

$$y_m = \frac{M}{\sigma \sqrt{2\pi}}$$

dando $M = y_m \sigma \sqrt{2\pi} = 2{,}506\ \sigma\ y_m$

(Fórmula 22.)

Conhecendo então os dois parâmetros σ e y_m, podemos calcular a área pela fórmula indicada. A altura máxima (y_m) de cada pico pode-se medir com precisão, mas para achar o parâmetro σ temos que fazer uma aproximação baseada nos seguintes fatos: Consultando uma tabela das abcissas e ordenadas da curva normal, verificamos que a abcissa é igual a σ para um ponto cuja ordenada é $\frac{0{,}2420}{0{,}3989}$ da ordenada máxima. Esta fracção corresponde aproximadamente a 60 % da altura (y_m) da curva (valor exato: 60,66 %). Basta assim medir a abcissa de um ponto da curva situada 2/5 abaixo do pico. Este ponto corresponde também ao ponto de inflecção da curva normal, onde a tangente atinge um ângulo máximo com a base. Podemos calcular a ordenada (y_1) do ponto de inflecção pela fórmula

(Fórmula 23.).

$$y_1 = \frac{y_m}{\sqrt{e}} = 0{,}606\ y_m$$

Uma vez determinado o valor de σ e calculada a área pela fórmula 22. podemos traçar a curva inteira por meio da seguinte relação entre as abcissas e ordenadas de alguns pontos da curva normal.

ABCISSA	ORDENADA
0	y_m
0,5 σ	0,885 y_m
1,0 σ	0,606 y_m
1,5 σ	0,325 y_m
2,0 σ	0,135 y_m
3,3 σ	0,004 y_m

O último valor da ordenada na tabela acima é praticamente zero e podemos concluir que para fins práticos a base da curva tem um comprimento de 3,3 σ + 3,3 σ = 6,6 σ. Quando os picos estão bem separados de tal maneira que a área entre eles toca a linha da base, não ha nenhuma dificuldade na análise geométrica; mas em geral as condições experimentais não permitem chegar até a separação total das divisas. Nestes casos podem surgir várias complicações:

a) Duas divisas parcialmente superpostas
  1 — sem modificação da altura dos picos
  2 — com modificação da altura de um pico
  3 — com modificação da altura de dois picos

b) Tres divisas parcialmente superpostas.

Verificamos que ha sempre nos lados extremos de cada perfil uma parte da curva que provém de uma única divisa. Aproveitamos assim dois pontos naquela parte da curva para calcular o resto e determinar o valor do parâmetro σ pela fórmula

$$\sigma^2 = \frac{x_2^2 - x_1^2}{2 \ln y_1/y_2}$$

onde x_1 é a abcissa do ponto P_1 e x_2 do ponto P_2.
y_1 e y_2 são as ordenadas correspondentes. Transformando em logaritmos comuns, vamos obter

$$\sigma^2 = 0{,}217 \frac{x_2^2 - x_1^2}{\log y_1/y_2}$$

(Fórmula 24.)

A análise geomêtrica do perfil compreende, em resumo, os seguintes passos:

1.°) Aumentar o perfil fotográfico por projeção ou com pantógrafo para obter uma cópia ampliada.

2.°) Marcar a linha da base e os contornos do perfil, usando a margem inferior no caso de linhas grossas.

3.°) Indicar o ponto de origem, i.e. a posição inicial da divisa antes da passagem da corrente.

4.°) Traçar linhas perpendiculares á linha da base através dos picos do perfil, indicando assim a posição das divisas que são discerniveis á primeira inspecção.

5.°) Escolher dois pontos na parte mais avançada do perfil, determinar suas ordenadas e abcissas a partir da última ordenada máxima e calcular σ pela fórmula 24.

6.°) Marcar a base da curva, ($= 6{,}6\ \sigma$) e observar si ela corresponde ao ponto mais avançado do perfil. Si isso não fôr o caso, um dos pontos escolhidos não faz parte da mesma curva e o contorno total não corresponde a uma única divisa mas a duas ou mais que estão parcialmente superpostas. Neste caso pode-se usar a medida da metade da base real. do ponto mais avançado até o pé da primeira ordenada máxima, para calcular σ e traçar então os contornos da primeira divisa pela tabela acima, deduzindo o valor de (y_m) do ponto de inflecção.

7.°) Traçar provisoriamente a outra metade da curva, tomando-a como simétrica em redor da ordenada máxima. A verificação posterior da soma das alturas em vários pontos permite descobrir si alguma das curvas não foi simétrica e corrigir o desvio.

8.°) Observar em que ponto a primeira curva se afasta do perfil e determinar a abcissa deste ponto a partir da segunda ordenada máxima. Esta distância é a base da metade mais avançada da segunda curva.

9.°) Continuar desta maneira até analisar todo o perfil, conferindo sempre a soma das alturas e marcar a diferença, onde houver, como nova ordenada, descobrindo assim as divisas escondidas.

10.°) Calcular a área em baixo de cada curva pelas fórmulas indicadas e medir as distâncias das ordenadas máximas a partir do ponto de origem, para determinar a mobilidade, lembrando-se de dividir pelo fator de aumento linear da máquina fotográfica e da ampliação da cópia.

h) *Cálculo da mobilidade aparente*

A mobilidade electroforética é definida como a velocidade num campo de força H = 1. Si (w) é o caminho percorrido no tempo (t), então

$$v = \frac{w}{t} \qquad \text{e a mobilidade } u_A = \frac{v}{H} = \frac{w}{t\,H}$$

O campo de força (H) é uma função da corrente:

$$H = \frac{I}{\Omega\, k_S}$$

onde I = corrente em ampéres
Ω = área transversal da célula
k_S = condutibilidade específica

Assim vamos obter

$$u_A = \frac{w\, k_S\, \Omega}{I\, t}$$

(Fórmula 25.)

onde (w) é o caminho em centímetros percorrido pela divisa em (t) segundos, num meio de condutibilidade (k_S) através de um tubo de secção transversal de (Ω) cm^2 sob o impulso de uma corrente eléctrica de (I) ampéres. Também,

$$I = \Omega\, k_S\, E$$

onde (E) é a voltagem por cm na célula, dando

$$u_A = \frac{w}{E\, t}$$

(Fórmula 26.)

Ha, entretanto, certa dificuldade técnica em medir a queda de potencial na célula e porisso preferimos usar a fórmula 25, embora ela exija conhecimento da condutibilidade. Esta pode ser determinada aparte, colocando uma célula de condutibilidade num banho da mesma temperatura do experimento electroforético e usando o método de Kohlrausch para medir a condutibilidade com uma ponte de Wheatstone, alimentada por corrente alternada de alta ciclagem, e que tem um alto-falante ou um ôlho eléctrico no lugar do galvanómetro. (Figura 42).

FIGURA 42

VI) RESUMO

Nesta primeira parte do seu trabalho, os autores apresentam a teoria da electroforese de partículas coloidais. Eles explicam os métodos em uso, dando detalhes da técnica e indicando os processos de análise das observações electroforéticas.

SUMMARY

In this first part of their publication the authors present the theory of electrophoresis of colloidal particles. They explain the methods in use, giving details of the technique and indicating the processes of analysis of electrophoretic observations.

ZUSAMMENFASSUNG

In diesem ersten Teil ihrer Arbeit geben die Autoren einen Überblick über die Theorie der Elektrophorese von kolloidalen Teilchen. Sie erklären die verfügbaren Methoden, zeigen Einzelheiten der Technik und der Analyse von elektrophoretischen Beobachtungen.

LISTA DOS SÍMBOLOS USADOS

A = amperímetro
AG = agitador
B = banho
BV = bomba de vácuo
C = constante da forma da partícula

CE = célula electroforética
CG = chave geral da entrada de 110 volts, corrente alternada
D = constante de difusão
E = tensão em volts
EM = eixo do motor da lâmina horizontal
F = área da fórmula de Wiedemann
FL = fendas e lâminas do sistema óptico
FO = motor do fecho da objetiva
G = geladeira do banho
H = força do campo elétrico
I = corrente em ampéres
K = incremento específico da refração
L = lâmpada
LC = motor da lâmina e chapa
LS = lente "Schlieren"
M = número de partículas
N = número de Avogadro
O = objetiva
OT = tubo óptico
P = ponto da curva de Gauss
Q = área da secção transversal da célula
R = relógio
RC = retificador da corrente
S = diafragma da lâmpada
SS = motor da seringa sincronizada
T = temperatura absoluta
TG = termoregulador do banho
TL = transformador da lâmpada
TR = trilho do sistema óptico
V = voltmetro
VF = vidro fosco
Z = lente cilíndrica

lado A = lado ascendente da célula
lado D = lado descendente da célula

a = grossura da célula electroforética
b = distância entre célula e fenda
c = concentração
d = grossura da camada eléctrica dupla de Helmholtz
e = carga do electron
f = plano de contacto de duas soluções
g = constante de proporcionalidade
h = altura na célula
i = espécie iônica
j = relação entre o movimento da chapa e o movimento da lâmina

k = constante de Boltzmann
k_S = condutibilidade específica
m = fator de aumento da máquina fotográfica
n = índice de refração
p = probabilidade estatística
q = carga eléctrica
r = raio de partícula esférica
s = fator de aumento da fórmula de Wiedemann
t = tempo
u = mobilidade electroforética
v = velocidade electroforética
w = caminho traçado pela imagem da divisa
x = abcissa da curva de Gauss
y = ordenada da curva de Gauss
z = valência
α = fracção da globulina plasmática
β = fracção da globulina plasmática
γ = fracção da globulina plasmática
δ = desvio vertical da luz
ε = constante di-eléctrica
ζ = potencial electrocinético
η = constante de viscosidade
θ = ângulo de fenda inclinada
$\varkappa$ = constante de Debye e Hückel
μ^- = força iônica
σ = desvio padrão da distribuição de Gauss
φ = fibrinogênio
Δ = diferença
Σ = soma

VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Nota: Incluimos apenas aquelas publicações que contêm detalhes da técnica electroforética e da análise dos perfis.

1. *Ambramson, H. A.* — Influence of size, shape, and conductivity on cataphoretic mobility, and its biological significance, *J. Phys. Chem.* **35**: 289, 1931.
2. *Abramson, H. A.* — Electrokinetic Phenomena and their Application to Biology and Medicine, New York, Chemical Catalog Company, 1934.
3. *Abramson, H. A., Moyer, L. S., Gorin, M. H.* — Electrophoresis of proteins, New York, Reinhold Publishing Corporation, 1942.
4. *Burton, E. F.* — Helmholtz double layer related to ions and charged particles, Colloid Symposium Monograph, New York, Chemical Catalog Company Inc., 1926, vol. 3, pp. 132-144.
5. *Dole, V. P.* — A theory of moving boundary systems formed by strong electrolytes, *J. Am. Chem. Soc.*, **67**: 1.119, 1945.

6. *Edsall, J. T.* — The plasma proteins and their fractionation. 2. Electrophoretic Measurements, *in* Anson, M. L. & Edsall, J. T., Advances in Protein Chemistry, New York, Academic Press Inc. Publishers, 1947, vol. 3, pp. 392-401.

7. *Freundlich, H.* — Kapillarchemie, Leipzig, Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H., 1909, pp. 223-231.

8. *Geddes, A. L.* — Diffusivity. *in* Weissberger, A., Physical Methods of Organic Chemistry, New York, Interscience Publishers Inc., 1945, pp. 295-303.

9. *Gouy, L.* — Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte, *Journ. de Phys.*, **9**: 457, 1910.

10. *Kekwick, R. A.* — The electrophoretic analysis of normal human plasma, *Biochem. J.*, **33**: 1.122, 1939.

11. *Lamm, O.* — Zur Bestimmung von Konzentrationsgradienten mittels gekrümmter Lichtstrahlen, *Ztschr. Phys. Chem.*, **138**: 313, 1928.

12. *Longsworth, L. G.* — A modification of the Schlieren method for use in electrophoretic analysis, *J. Am. Chem. Soc.*, **61**: 529, 1939.

13. *Longsworth, L. G.* — Recent Advances in the Study of Proteins by Electrophoresis, *Chem. Rev.*, **30**: 323, 1942.

14. *Longsworth, L. G.* — Optical Methods in Electrophoresis, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **18**: 219, 1946.

15. *Longsworth, L. G., & MacInnes, D. A.* — Electrophoresis of proteins by Tiselius Method, *Chem. Rev.*, **24**: 271, 1939.

16. *Longsworth, L. G., & MacInnes, D. A.* — The interpretation of simple electrophoretic patterns, *J. Am. Chem. Soc.*, **62**: 705, 1940.

17. *MacInnes, D. A.* — The Principles of Electrochemistry, New York, Reinhold Publishing Corp., 1939.

18. *MacInnes, D. A. & Longsworth, L. G.* — The electrophoretic study of proteins and related substances, *in* Alexander, J., Colloid Chemistry, NeZ York, Reinhold Publishing Corp., 1944, vol. 5, pp. 387-411.

19. *Moore, D. H.* — Optical Methods in Electrophoretic and Ultracentrifugal Analyses, *in* Glasser, O., Medical Physics, Chicago, Year Book Publishers Inc., 1944, pp. 827-830.

21. *Perlmann, G. E. & Kaufman, D.* — Effect of ionic strength and protein concentration in electrophoretic analysis of human plasma, *J. Am. Chem. Soc.*, **67**: 638, 1945.

22. *Philpot, J. St. L.* — Direct photography of ultracentrifuge sedimentation curves, *Nature*, **141**: 283, 1938.

23. *Shedlowsky, T.* — Conductometry, *in* Weissberger, A., Physical Methods of Organic Chemistry, New York, Interscience Publishers Inc., 1945, pp. 1.011-1.046.

24. *Svensson, H.* — Direkte photographische Aufnahme von Elektrophorese-Diagrammen, *Kolloid Ztschr.* **87**: 181, 1939.

24. *Tiselius, A.* — Electrophoresis of serum globulins, *Biochem. J.*, **31**: 1.464, 1937.

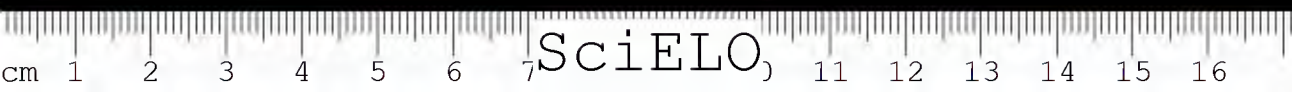
26. *Tiselius, A. & Kabat*, E. *A.* — Electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J. Exp. Med.* **69**: 119, 1939.

27. *Wiedemann, E.* — Die willkürliche Modifizierung der Milieubedingungen bei Elektrophorese-Versuchen zur Eliminierung der Extragradienten und ihre praktische Bedeutung. *Helv. Chim. Acta.* **30**: 168, 1947.

28. *Wiedemann, E.* — Über die Genauigkeit der Aufzeichnung von Elektrophorese — Diagrammen nach der Methode Philpot-Svensson bei Anwendung des Kleinbildverfahrens. *Helv. Chim. Acta,* 30: 639, 1947.

29. *Wiedemann, E.* — Ein neuer Spalt für die Aufnahme von Elektrophose-Diagrammen nach Philpot-Svensson. *Helv. Chim. Acta,* 30: 648, 1947.

30. *Wiedemann, E.* — Über die Auswertung von Elektrophorese-Diagrammen nach Longsworth und Philpot-Svensson. *Helv. Chim. Acta,* 30: 892, 1947.

31. *Wuhrmann, F. & Wunderly, Ch.* — Die Bluteiweisskörper des Menschen. Basal, Benno Schwabe & Co., Verlag 1947.

O USO DA NOVOCAINA INTRAVENOSA COMO ANALGÉSICO NA COLHEITA DA LINFA VACÍNICA

POR J. J. MACEDO & L. L. VELLINI

(Dos Laboratórios de Virus e Riquétsias, e Vacinico do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

O problema da anestesia nos laboratorios de produção de vacina jeneriana tem sido relegado a plano secundário, sendo, no entretanto um preceito inelegável, quer pela deshumanidade, quer pela reação do animal em detrimento de uma colheita asséptica e eficiente.

O uso da novocaina intravenosa (1.2), trouxe contribuição de valor, mas, sempre foi objeto de precauções, evitar-se direta inoculação na corrente circulatória (10).

Na ação inhibidora da atividade simpática ou bloqueio parcial do sistema (3,16) reside o efeito favorável no traumatismo.

A concentração de 7 a 8 vezes mais nos tecidos inflamados que nos normais como resultado da vaso dilatação local (4), proporciona analgesia suficiente.

O êxito alcançado na terapêutica humana (3,5,14,15,16) nos levou a empregá-la no laboratório de vacina jeneriana do Instituto Butantan.

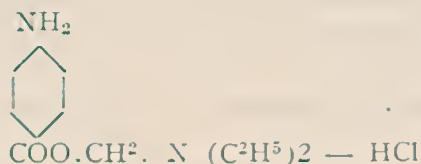
A vacina jeneriana de origem animal tem como tempo de evolução 5 dias completos, após preparo e conservação da vitela em local higiênico.

O emprego de curetas de Volkmann ou de outro instrumento para a colheita da linfa, faz com que, pela dor resultante do traumatismo operatório, o animal se debata constantemente em prejuizo do curso normal do trabalho. Para obviar esses inconvenientes, aplicamos a novocaina intravenosa, em vitelos, obtendo bons resultados, o que nos levou a publicar a presente memoria, descrevendo a experiencia realizada.

FARMACOLOGIA, QUÍMICA E POSOLOGIA (6)

A novocaina sendo um dos modificadores do sistema nervoso periférico inhibe as terminações sensitivas (16).

Entregue para publicação em 22 de novembro de 1949.

Como anestésico sintético, sucedâneo da cocaina e pertencente ao 4.º grupo de Forneau, no qual o ácido amino-benzóico esterifica um amino-álcool dando o paramino-benzóil-dietil-aminoetanol, sob forma de cloridrato, recebe as seguintes designações: procaina, alocaina, etocaina, scurocaina e sincaina.

Apresenta-se sob forma de agulhas cristalinas incolores, sabor ligeiramente amargo, solúvel em seu pêso de água e em 30 partes de álcool, precipitando-se em meio alcalino.

Não provoca irritação nos tecidos nem hiperemia. E' pouco tóxica, 8 vezes menos que a cocaina, sendo seu efeito anestésico apenas 3 vezes menor.

POSOLOGIA

Infiltração	de 0.25 a 2%
Troncular	de 0.25 a 0.50%
Epidural	0,50%
Venosa (7)	0.004 mg por Kpv
Intra-raqueana	0.010 mg por 5 quilos de pêso num máximo de 0,100 mg total. (6).

Muschen, Rendel, Baker, calcularam a dose venosa, em 0.004 mg por quilo de peso vivo.

TOXICIDADE

As reações tóxicas graves ou fatais são raras. Alguns autores (8,9,10) observaram no homem:

a) Ligeiras contrações, convulsões, exaustão e exitus, devido a hipersensibilidade e irritabilidade relacionadas com o sistema nervoso central.

b) Paralisia do centro respiratório.

Tratamento das reações tóxicas (7,10,11):

item a) Administração de barbitúricos

item b) Oxigenioterapia, estimulantes respiratórios e circulatórios.

Metabolismo:

O desdobramento da novocaina se faz no fígado (12) e na corrente circulatória por ação de uma enzima (7), não sendo comprometida a função hepática (13).

MATERIAL E MÉTODOS

Novocaina: Usamos um sal de procedência nacional (*), quimicamente puro. diluído em água distilada a 1% com pH 4,4 e a 2,5% com pH 4,6, distribuido em empolas de 20 ml, esterilizadas em autoclace 120.° — 20 m.

Aplicação: Após preparo do animal de acôrdo com a rotina do laboratório, injetamos na veia jugular, intermitentemente, quantidades variáveis conforme os protocolos de observações (quadro e gráfico I. Fotografias 1-2-3 e 4).

A atenuação do efeito analgesico sendo de 15 a 25 minutos o importante na dose total usada é a quantidade injetada em relação ao tempo.

A injeção sob a forma intermitente permite o uso da solução mais concentrada, com a vantagem de efeito analgesico mais rapido e sem qualquer inconveniente para o animal.

Em nossas observações com as doses entre 0,004210 e 0,013630 mg por Kpv. e concentração de novocaina a 1% e 2,5% não verificamos qualquer reação toxica, obtendo inteiro sucesso na analgesia.

COMENTÁRIOS

Empregando pela primeira vez a novocaina intravenosa, com o intuito de analgesia em vitelas submetidas a vacinação com virus vacinico, obtivemos bons resultados entre os limites de 0,004210 a 0,013630 mg por Kpv das soluções a 1% e 2,5%, em injeção lenta mantida durante a intervenção.

O animal permanece quieto estando em condições de caminhar normalmente logo após a operação.

RESUMO E CONCLUSÕES

1) O emprego de novocaina é eficiente por injeção intravenosa lenta, no decurso das intervenções inoculadoras e de colheita, em vitelas vacinadas com virus vacinico, pois produz *analgesia suficiente sem narcose*, o que representa grande vantagem.

2) A operação se processando entre 10 e 15 minutos e o declinio do efeito analgésico se iniciando depois dos 15 minutos, a relação entre o tempo e a quantidade de novocaina injetada justifica darmos os limites de 0,004 a 0,010 mg por quilo de pêso vivo, levando-se em consideração a suceptibilidade individual observada no acto da operação.

(*) Indústria Elpis Ltda.

3) As soluções que a principio foram de 1% e, posteriormente, 2,5% demonstraram a mesma eficiência, tendo, porém, a mais concentrada a vantagem de volume menor e efeito mais rápido.

4) O preço do sal, a facilidade no preparo, a estabilidade das soluções e a eficiência do método justificam o emprego da novocaina na rotina de colheita de linfa vacínica.

5) O uso da novocaina como analgesico pela via intravenosa em grandes animais, é indicado, para as pequenas operações.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

(1) The use of novocaine by slow intravenous injection is efficient during the inocculation and scraping of calves vaccinated with cow-pox virus.

2) Sufficient analgesis is produced without narcosis, thereby representing a great advantage.

3) With the operation lasting 10-15 minutes and the analgesic effect declining after 15 minutes, the relation between the time and the amount of novocante injected justifies the limits of 0,004 to 0,010 mg per kg of live weight, taking into consideration the individual susceptibility observed during the operation.

4) The first solutions at 1% and the later at 2.5% showed the same efficiency, with the more concentrated one having the advantage of smaller volume and swifter action.

5) The price of the salt, the facility in the preparation, the stability and efficiency justify the use of novocaine in the routine harvesting of vaccine lymph.

6) The intravenous use of novocaine as an analgesic in large animals is indicated for minor operations.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Eine langsame, intravenöse Injektion von Novocain ist wirksam während der Ipfung und Gewinnung der Lymphe von Kälbern, die mit Pocken-Impfstoff behandelt werden.

2) Es entsteht eine ausreichende Schmerzstillung ohne Narkose, was von grossem Vorteil ist.

3) Da die Operation etwa 10-15 Minuten dauert und die schmerzstillende Wirkung nach 15 Minuten nachlässt, so berechtigt die Beziehung zwischen der Zeit und der injizierten Novocain-Menge die Gabe von 0,004 bis 0,010 mg pro kg Lebendgewicht, wenn man die individuelle Empfindlichkeit, wie sie bei der Operation beobachtet wird, in Betracht zieht.

4) Die urpsrünglichen Lösungen von 1% und die späteren von 2,5% haben dieselbe Wirkung, die stärkere hat jedoch den Vorteil des geringeren Volumens und der schnelleren Wirkung.

5) Der Preis des Salzes, die Leichtigkeit der Herstellung, seine Haltbarkeit und Wirksamkeit empfehlen den Gebrauch von Novocain bei Gewinnung von Pocken-Lymphe.

6) Novocain, intravenös, empfiehlt sich als schmerzstillendes Mittel für grosse Tiere bei kleineren Operationen.

BIBLIOGRAFIA

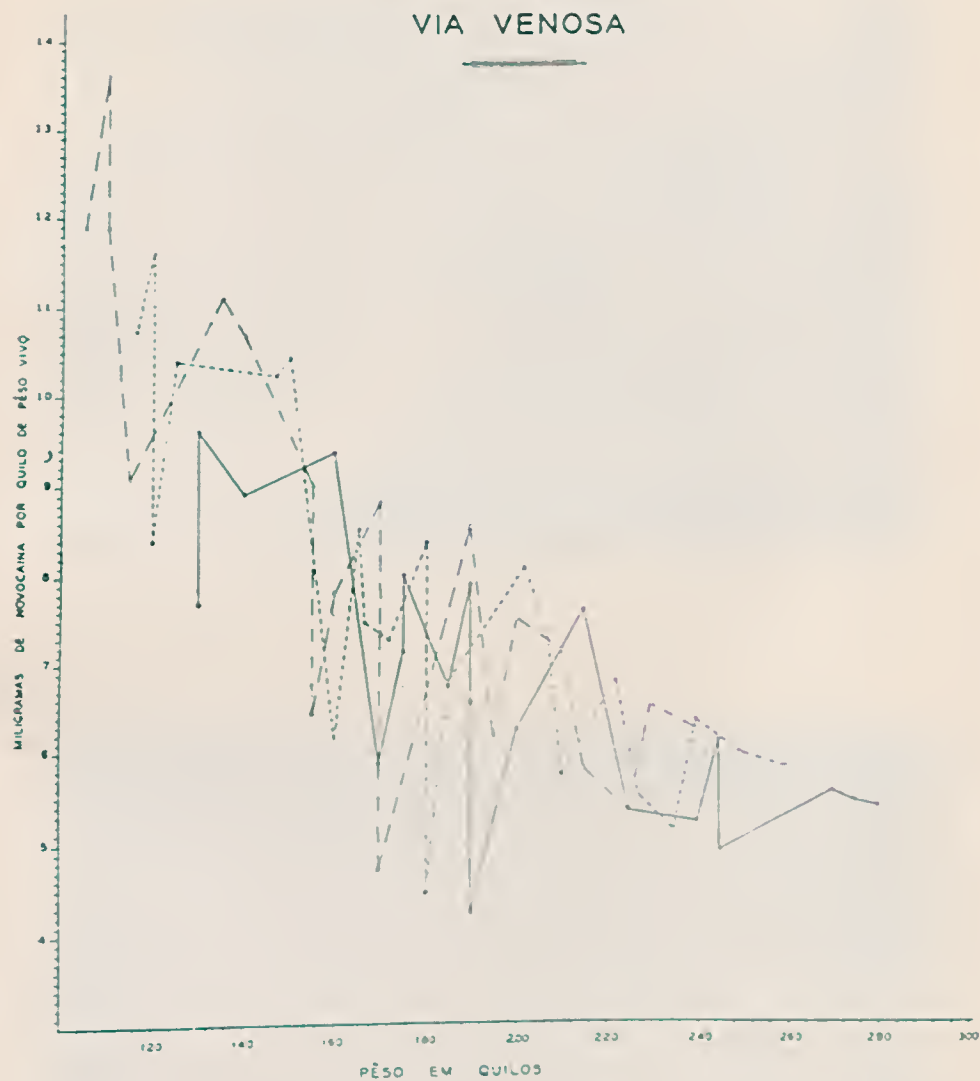
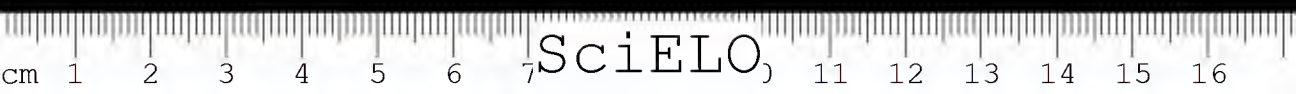
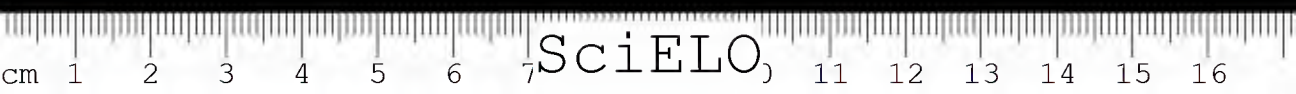
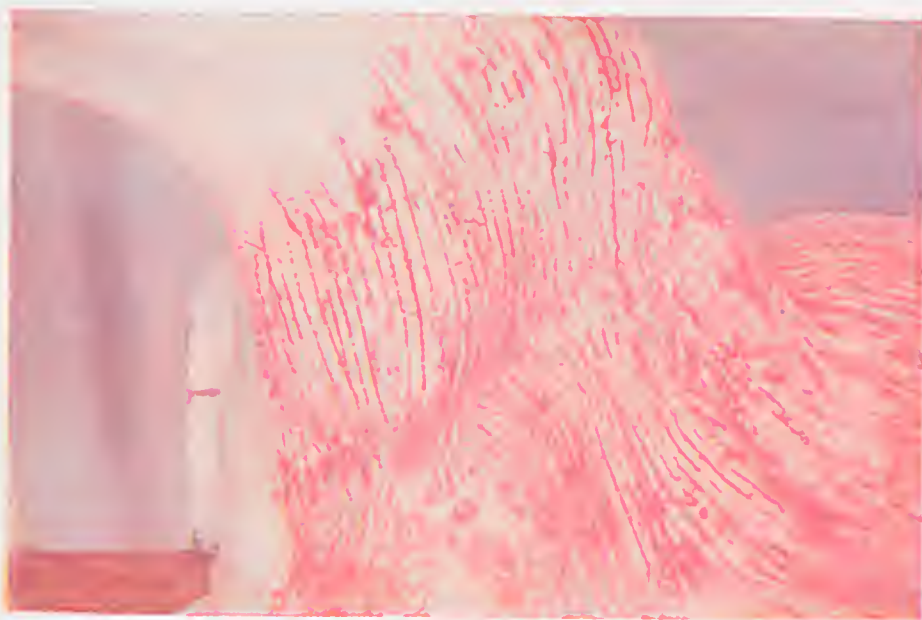
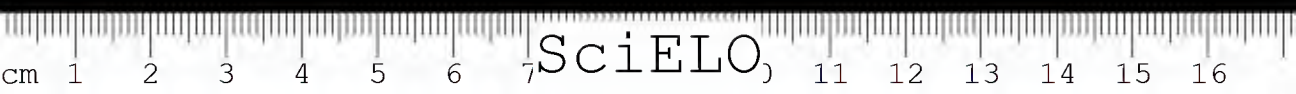
1. *Bier, A.* — *Munch. Med. W'schr.* 1: 589, 1909.
2. *Leriche, R. & Fontaine, R.* — *J. Chir. Brux.* 34: 537, 1935.
3. *Gondon, R. A.* — Applied intravenons procaine — *Canadian Med. Assoc. J.* 56: 534-35, 1946.
4. *Graubard, P. J. & Ritter, H. H.* — *Amer. J. Surgery* 74: 765, 1947.
5. *Gordon, R. A.* — Intravenons novocaine for an analgesia in burns — *Canadian Med. Assoc. J.* — 49: 478-481, 1943.
6. *Soto, Mario* — Farmacologia y terapeutica, ed. 2, Buenos Aires, El Ateneo, 1941, t. 2.
7. *Mushin, W. W. & Rendel, Baker, L.* — Intravenons procaine — *Lancet* 1(15): 619-24, 1949.
8. *Mayer, E.* — Toxic effects following the use of local anesthetics — *J. Amer. Med. Assoc.* 82: 876-85, 1924.
9. *Bieter, R. N.* — Applied pharmacology of local anesthetics — *Amer. J. Surgery* 34: 500-10, 1936.
10. *Gilman, S.* — The tratment of dangerous reactions to novocain — *New Engl. J. Med.* 219: 841, 1938.
11. *Henry & Sttiles* — *Amer. Jour. Surg.* 32: 217-221, 1936.
12. *Fosdick, L. S. & Hansen, H. L.* — *Dent. Cosmos* 73: 1.082, 1931.
13. *Jacoby, J. J.; Coon, J. M.; Woolf, M. P. & Salermo, P. R.* — *Anesthesiology* 9: 481, 1948.
14. *Leriche, R.* — *Presse Med.* 49: 641-645, 1941.
15. *Gordon, R. A.* — *Canadian Med. Assoc. J.* 59(6): 534-35, 1948.
16. *Frommel, E.* — *Therapeutische Umschau* — 2: 193-195, 1949.

QUADRO I

VITELAS			NOVOCAINA					
NÚMERO	PESO — KG		SOL. %	VOL. ML	G	QUANTIDADE INJETADA POR KG		
	Vacinação	Colheita				Vacinação	Colheita	Média
74	215	225	1,0	120	1,2	0,004897	0,005333	0,005115
78	225	195	1,0	120	1,2	0,005333	0,006153	0,005743
44	200	170	2,5	50	1,25	0,006250	0,007352	0,006807
63	175	160	2,5	50	1,25	0,007142	0,007812	0,007477
77	185	160	2,5	50	1,25	0,006756	0,007812	0,007284
81	240	215	2,5	50	1,25	0,005208	0,005813	0,005510
80	245	200	2,5	60	1,50	0,006122	0,007500	0,006811
75	245	200	2,5	60	1,50	0,006122	0,007500	0,006811
53	215	190	2,5	65	1,625	0007604	0,008554	0,008078
82	280	240	2,5	60	1,50	0,005357	0,006250	0,005803
83	160	135	2,5	60	1,50	0,009375	0,011111	0,010243
84	270	210	2,5	60	1,50	0,005555	0,007142	0,006348
85	275	230	2,5	60	1,50	0,005454	0,006521	0,005987
86	280	240	2,5	60	1,50	0,005357	0,006250	0,005803
90	160	140	2,5	60	1,50	0,009375	0,010714	0,01044
92	130	105	2,5	50	1,25	0,009615	0,011904	0,010759
94	140	110	2,5	50	1,25	0,008928	0,011904	0,010416
95	190	170	2,5	60	1,50	0,007894	0,08823	0,008358
98	130	110	2,5	50	1,25	0,009615	0,013630	0,011622
99	210	200	1,0	150	1,50	0,007142	0,007500	0,007321
102	190	170	1,0	80	0,80	0,004210	0,004705	0,004457
103	175	155	1,0	140	1,40	0,008000	0,009032	0,008516
104	190	170	2,5	50	1,25	0,006578	0,007352	0,006965
107	170	155	2,5	40	1,00	0,005882	0,006451	0,006166

Visto o animal não ser repesado no momento da colheita, foi considerado o peso de 5 dias antes, tomado por ocasião da vacinação. Este peso caiu no decurso da evolução da vacina, como se infere na nova tomada logo após a colheita.

Nenhum inconveniente se observou, tomando por base o peso inicial.

INOCULAÇÃO DE NOVOCAINA
VIA VENOSA
MILIGRAMAS DE NOVOCAINA POR QUILO DE PÊSO VIVO
PÊSO EM QUILOS
LEGENDA
PÊSO ANTERIOR DO VITELO
PÊSO POSTERIOR DO VITELO
PÊSO EM MEDIA
MEDIA GERAL

Mem. Inst. Butantan,
22:127 138, Nov.º 1950.

Mem. Inst. Butantan,
22:127 138, Nov.º 1950.

SOBRE DOIS BATRÁQUIOS DA ILHA DA QUEIMADA GRANDE

POR ARISTOTERIS T. LEÃO

(*Trabalho da Secção de Zoologia Médica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil*)

No periodo compreendido entre 14 e 23 de abril de 1947 fizemos uma excursão à Ilha da Queimada Grande, situada a cerca de 40 milhas a S. O. da barra de Santos, no litoral do Estado de São Paulo.

Uma segunda viagem foi realizada entre 22 de setembro e 6 de outubro do mesmo ano, sendo que desta vez permanecemos 3 dias numa ilhota proxima — a Ilha da Queimada Pequena — onde não encontramos nenhum batráquio.

Ao que nos consta da Ilha da Queimada Grande só havia sido visitada, com finalidades zoologicas, por Amaral (1920) que lá esteve por duas vezes no mesmo ano.

Quando de nossa primeira visita, já estavamos no 5.º dia de estadia e, apesar de insistentes pesquisas, não haviamos conseguido vislumbrar siquer um batráquio. No 6.º dia, porém, após pequena chuva, fomos alertados por uma voz que assim podemos representar: Kriii — Kriii — Kriii —. Pusemo-nos imediatamente a campo e sem muita dificuldade fomos deparar com uma touceira de uma *Bromeliaceae* terrestre e de onde provinha o canto. Após um cerco cuidadoso (limpesa previa e circular do ambiente) cortamos as *Bromeliaceae* e aí conseguimos capturar adultos, jovens, girinos e certo numero de ovos, envoltos em massa gelatinosa transparente, de uma *Hyla*.

Durante a segunda excursão o coaxar desta *Hyla* era muito frequente e desta vez obtivemos dezenas de exemplares entre adultos, jovens, girinos e ovos.

Na Ilha da Queimada Grande conseguimos obter duas especies de *Anura*: uma *Hyla* do complexo *catharinae*, vivendo em *Bromeliaceae* terrestre que, graças à gentileza da Dra. Bertha Lutz, que nos comunicou estar revendo o grupo, foi determinada como *Hyla perpusilla* Lutz & Lutz, 1939. O outro é um *Eleutherodactylus binotatus* tipico, apenas ligeiramente mais escuro que os do continente.

Hyla perpusilla Lutz & Lutz, 1939

ADULTOS: Cabeça arredondada, pouco mais longa do que larga. Boca de hiato começando no bordo anterior do timpano. Canto rostral visivel, porém, muito pouco pronunciado, com lôro pouco excavado. Focinho saliente, voltado

Entregue para publicação em 13 de Dezembro de 1949.

para cima. Timpano saliente, pouco menor que o diametro ocular, com uma prega supra-timpanica que, começando no bordo posterior do olho, vai terminar mais ou menos na altura da face superior do ante-braço. Dentes vomerinos em dois grupos compactos, situados mais ou menos na altura equatorial das coanas. Estas relativamente grandes, de abertura antero-posterior inclinada para fora. Pré-maxilares em ponta internamente. Maxilares com dentição uniforme, faltando esta no 1/4 posterior. Mandibula edentula. Lingua circular, pouco entalhada e livre posteriormente. Aparelho esternal do tipo arcifero, de omosterno cartilaginoso, em forma de cone, de ponta romba; xifisterno cartilaginoso, pouco entalhado posteriormente. Dedos inteiramente livres, não fimbriados, com tuberculos sub-articulares bem evidentes, porém, não muito desenvolvidos; calo metacarpal externo maior que o interno, com um sulco mediano; calo metacarpal interno ovoide-alongado, inteiro; ordem de tamanho dos dedos: 1, 2, 4, 3; ultima falange terminando em disco arredondado, convexo em sua face inferior e concavo na superior. Artelhos fimbriados, com membrana pouco desenvolvida; 1.° e 2.° artelhos livres, 2.° e 3.°, e 4.° e 4.° e 5.° com membrana até a 1a. articulação; tuberculos sub-articulares evidentes, não muito desenvolvidos; calo matatarsal externo pouco evidente, arredondado; calo metatarsal interno ovoide, evidente; ultima falange terminando em disco arredondado, convexo na sua face inferior e concavo na superior; ordem de tamanho dos artelhos: 1, 5, 3, 2, 4; articulação tibio-tarsal alcançando o meio do lóro.

Região dorsal do corpo, dos membros e da cabeça lisas (sem granulação); região ventral do corpo, do femur e da gula finamente granulosas.

Coloração (alcool): Região dorsal do corpo, dos membros e lados do corpo variando do cinzento-azulado ao bruneo; em geral uma faixa mais clara no centro do dorso, da nuca ao anus; região infra-ocular com um espaço mais claro; região ventral clara, às vezes finamente pintalgada de bruneo, sendo esta mais intensa na região gular; femur tarjado de bruneo na sua face superior e inferior clara; tibia com coloração mais escura que o femur; pés, artelhos, braços e mãos tarjados de bruneo superiormente e claros inferiormente.

Coloração (vivos): Coloração de fundo pardo-clara ou escura; uma faixa dorsal mais clara; membros com tarjas escuras; face anterior e posterior do femur e da tibia amarelo-citrino.

Pupila horizontal. Macho com saco gular bem desenvolvido.

Voz: Kriii — Kriii — Kriii.

Dos exemplares capturados em 5/10/947 alguns foram colocados num frasco de boca larga, ao qual juntamos fragmentos e agua de *Bromeliaceae*. Logo depois de aí serem colocados (17 horas) coaxavam e se movimentavam intensamente procurando se acasalar. Às 20 horas já havia 3 casais em amplexo

sexual, que é axilar, com subsequente postura nesta mesma noite e no dia seguinte. Conseguimos transportar para o laboratorio esta postura, bem como girinos e adultos. No laboratorio, porém, apesar de frequentes acasalamentos não houve postura alguma. Os adultos foram mantidos vivos mais ou menos durante um mês, em cristalisadores de vidro de cerca de 20 cms de diametro, alimentando-os com *Drosophila* e *Musca domestica*. Coaxavam quer durante o dia quer durante a noite. Os ovos, infelizmente, não se desenvolveram.

Dados sobre os ovos, girinos e jovens: — Ovos medindo 1,3 a 1,5mm de maior diametro, com involucro gelatinoso transparente medindo cerca de 4-5mm de diametro.

Os girinos capturados a 5/10/947, nos mais variados estadios de desenvolvimento foram, no laboratório, colocados em cristalisadores de vidro de mais ou menos 20 cms de diametro, com um pedaço de tijolo no fundo para servir de ancoradouro, o qual era recoberto com uma tela de arame. A água era trocada todas as manhãs. Como alimento usamos o figado dessecado em pó que as larvas absorviam avidamente. Parece que os girinos não sofreram com a diferença de altitude a que foram submetidos (cerca de 80ms. no habitat e mais ou menos 750ms no laboratorio), pois estavam sempre muito ativos.

Infelizmente não pudemos levar a nossa observação desde a eclosão do ovo, pois como já dissemos, a postura não se desenvolveu.

Coloração: Cabeça-corpo plumbeo; cauda creme-clara com pigmentação esparsa, escura, não só na cauda como tambem na membrana, principalmente na face inferior. Boca ventral, não terminal, com duas fileiras de papilas no labio inferior, sendo esta tripla nos cantos da boca. Formula das laminas dentarias $\frac{\begin{matrix}1\\1\text{-}1\end{matrix}}{3}$. Anus central.

JOVENS: Os jovens recem-metamorfoseados apresentam todas as caracteristicas dos adultos, quer no que diz ás formas, quer quanto á coloração.

Habitat: Vivem em *Bromeliaceae* terrestres, em cujas coleções dagua realizam o ciclo biologico.

Distribuição geografica: Ilha da Queimada Grande, São Paulo, Brasil.

Eleutherodactylus binotatus (Spix, 1824).

Desta especie não conseguimos nem ovos, nem girinos. Os adultos foram encontrados sempre no sólo, no descampado ou na mata, em touceiras de *Bromeliaceae* terrestre e, principalmente, no local denominado "bananal", onde realmente existem muitas bananeiras (uma depressão). Aliás nunca encontramos este *Anura* sinão em lugares bem sombreados e úmidos.

DESCRIÇÃO

Cabeça lanceolada, pouco mais longa do que larga. Boca de hiato começando no terço anterior do timpano. Canto rostral evidente, com lôro pouco escavado. Timpano relativamente fundo, de maior diâmetro transversal, pouco menor que a metade do diâmetro ocular, com uma prega supra-timpanica que, partindo do bordo posterior do olho, vai até o meio da espadua, em direção à axila. Pupila horizontal, ovoide. Dentes vomerinos em duas fileiras curvas, bem posteriores às coanas, estando os ramos externos apoiados sobre o palatino; dentes de tamanho uniforme e em 17 em cada fileira. Coanas relativamente grandes, com abertura antero-posterior inclinada para fóra. Pré-maxilares em ponta internamente, de dentição uniforme, sendo 11-12 dentes em cada lado. Maxilares de dentição uniforme, diminuindo o tamanho dos dentes apenas na extremidade posterior. Mandibula edentula. Lingua piriforme, pouco entalhada e livre posteriormente. Aparelho esternal do tipo arcífero, com omosterno cartilaginoso, em forma de lança, de ponta romba; xifisterno cartilaginoso, quadrangular e entalhado no bordo apical. Hioideo formado por duas peças de dilatação basal interna, por meio das quais se ligam anteriormente, de ramos divergentes praticamente sem dilatação. Dedos inteiramente livres, não fimbriados, com tuberculos sub-articulares bem evidentes; calo metacarpal externo dividido; calo metacarpal interno oval, inteiro; ordem de tamanho dos dedos: 2, 4, 1, 3; ultima falange T-forme, com dilatação achatada dorso-ventralmente e recurvada para baixo. Artelhos com membrana vestigiaria e tuberculos sub-articulares bem evidentes; disco achatado dorso-ventralmente e recurvados para cima, com uma depressão na sua extremidade apical; calo metatarsal interno pequeno, inteiro e oval; calo metatarsal externo pequeno, arredondado; ultima falange dilatada, T-forme; ordem de tamanho dos artelhos: 1, 2, 5, 3, 4; articulação tibio-tarsal atingindo o meio do lôro. Disco ventral evidente. Dorso, lados do corpo, região dorsal dos membros e posterior das coxas, região loreal, infratimpanica e infra-ocular, com granulação bem evidente; região abdominal com granulação fina; região gular, anterior e ventral dos membros, bem como o topo da cabeça, lisas.

Coloração: Região loreal, da ponta do focinho até mais ou menos o bordo posterior dos olhos, de coloração escura-azulada; região frontal até o meio dos olhos, creme com pontilhado escuro; prega-supra-timpanica com bordo inferior escuro; ponta do focinho com uma listra longitudinal clara; dorso de coloração variavel, desde o marron-claro ao cinza-claro; u'a mancha escura, central, na altura da escapula; duas manchas escuras paralelas, na altura da vertebra sacra; ventre claro, alvadio; bordos da mandibula manchados ou pintalgados de escuro; região escapular e gular com manchas irregulares marron-escuras; face inferior

dos braços alvadia; face anterior posterior e dorsal dos braços e dos dedos marron-escuras e pintalgadas de claro; uma tarja mais escura no ante-braço; membros posteriores com tarjas escuras; tarsos e artelhos escuros. Pragas latero-dorsais bem evidentes, iniciando no bordo posterior e superior dos timpanos e alcançando ou ultrapassando o meio do urostilo; pregas dorso-laterais em numero de tres; a interna inicia na altura do timpano, recurva para o meio do corpo e alcança o meio do urostilo; a mediana iniciando na altura do bordo posterior da escapula e terminando mais ou menos na vertebra sacra; a externa se inicia pouco atrás da ultima e termina mais ou menos na mesma altura; tres estrias iniciando no bordo posterior da palpebra, inclinando para o centro do dorso e terminando mais ou menos na altura da escapula.

Dimorfismo sexual: Femeas bem mais desenvolvidas que os machos.

RESUMO

Na Ilha da Queimada Grande, situada a mais ou menos 40 milhas a S. O. da barra de Santos, no litoral do Estado de São Paulo, foram encontrados dois representantes dos *Anura*: uma *Hyla* do grupo *Catharinae* — *Hyla perpusilla* Lutz & Lutz, 1939, vivendo em *Bromeliaceae*, onde realizam o ciclo vital, assim como *Eleutherodactylus binotatus* (Spix, 1824).

Da primeira são fornecidos dados sobre os adultos, jovens, girinos e ovos e do ultimo uma descrição dos adultos.

ABSTRACT

In the Queimada Grande Island, State of São Paulo, Brazil, were obtained two representaitive of the *Anura:* One *Hyla* of the complex *catharinae, Hyla perpusilla* Lutz & Lutz, 1939 living in *Bromeliaceae* where they accomplish their life history, as well as *Eleutherodactylus binotatus* (Spix, 1824).

Data are given of the adults, juvenils, tadpoles and eggs of the former and, of the latter a description of the adults.

BIBLIOGRAFIA

1. Amaral, A. — Col. dos Trab. do Inst. Butantan, 2:49, 1918-1924.
2. Lutz, A. & Lutz, B. — An. Acad. Brasil. ci. 11:67, 1939.

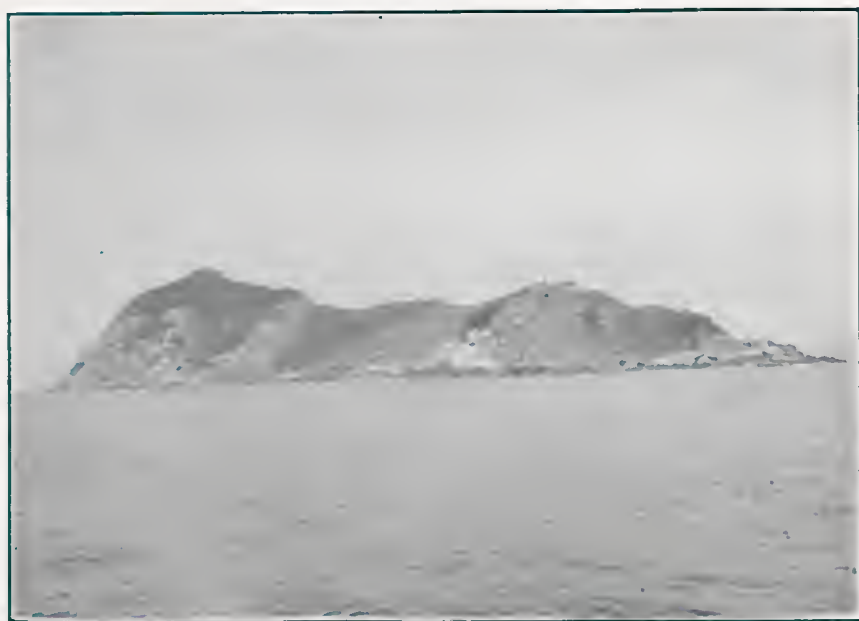
	MEDIDAS												
HYLA PERPUSILLA	ADULTOS										JOVENS		
	974	1.165	1.176	1.172	1.162	1.154	1.168	1.153	1.179	1.158	2.334	2.332	2.333
Compr. do corpo:	1,86	19,8	19,8	20,5	20,7	20,7	21,0	23,7	23,8	25,5	12,0	12,0	14,0
Compr. da cabeça:	7,7	7,7	8,2	7,9	7,8	7,9	8,2	9,5	10,0	9,8	4,9	5,2	5,2
Largura da cabeça:	7,2	7,0	7,2	7,0	7,7	7,5	7,7	8,9	9,3	9,4	4,9	4,7	5,1
Compr. do femur:	9,7	9,0	10,3	8,4	8,8	8,7	8,8	11,3	12,2	11,5	5,8	5,6	6,3
Compr. da tibia:	11,0	11,0	10,8	11,2	11,1	11,5	11,5	13,9	13,3	13,6	6,5	6,5	7,6
Compr. do pé á ponta do 4º artelho:	13,8	13,2	14,0	13,3	14,0	13,7	14.0	16,7	17,3	17,5	8,5	8,0	8,5
Menor distancia entre as choanas:	1,5	2,1	1,8	2,0	2,0	1,9	2,0	2,0	2,5	2,9			
Espaço entre as narinas:	1,8	1,9	1,8	2,2	2,2	2,2	2,3	2,4	2,4	2,0	1,4	1,3	1,5
Dist. bordo ant. narina á ponta do focinho:	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0	1,1	0,4	0,5	0,6
Dist. bordo post. calo carp. á ponta 3º dedo:	4,7	5,0	5,5	5,5	5,5	5,5	5,7	6,0	6,7	6,8	3,7	3,0	4,0
Dist. bordo post. narina ao bord. ant. timpano:	5,2	5,8	5,4	6,2	6,2	6,6	6,6	6,8	7,4	7,2	4,0	3,6	4,0
Altura do timpano (transv.):	1,1	1,3	1,5	1,4	1,4	1,4	1,5	1,7	1,7	1,6	{ 0,4	0,3	0,6
Larg. do timpano (longitud.):	1,2	1,3	1,5	1,4	1,4	1,7	1,5	1,6	1,6	1,7			
Diametro ocular (longitud.):	2,4	2,6	2.7	1,8	2,8	2,7	2,3	8	2,9	3,4	1,0	1,5	1,8
Dist. bordo ant. olho á ponta do focinho:	3,8	3,7	4,1	3,9	4,0	3,8	4,2	4,4	4,7	4,0	2,8	2,5	2,8
Espaço interorbital anterior:	4,3	4,3	4,5	4,4	4,0	4,7	4,3	4,8	5,3	5.7	3,3	3,4	3,3

Hyla perpusilla

Medidas dos Girinos	2.325	2.326	2.327	2.331	2.328	2.329	2.330
Comprimento do corpo-cabeça	9,0	10,0	11,0	8,8	11,6	12,0	11,5
Maior largura	4,8	6,5	8,0	6,0	7,0	5,0	5,4
Espaço interorbital anterior	2,5	3,0	8,3	2,7	2,3	3,2	3,0
Espaço entre as narinas	1,5	1,8	1,7	1,6	1,3	1,4	1,4
Dist. bordo ant. olho à ponta do focinho	2,3	2,2	2,7	2,1	2,7	2,7	2,3
Comprimento da cauda	15,0	15,0	23,0	15,7	22,0	12,6	18,0

Eleutherodactylus binotatus	MEDIDAS									
N.o	1.129	1.126	1.135	1.149	1.137	1.218	1.128	1.130	1.139	1.141
Compr. do corpo:	26,8	30,0	35,7	38,0	43,5	45,0	48,0	53,5	55,0	58,6
Compr. da cabeça:	11,4	14,4	14,7	15,8	18,5	20,6	21,6	25,6	23,3	21,0
Largura da cabeça:	10,3	12,0	13,1	14,6	16,8	17,6	19,7	22,0	21,7	19,2
Compr. do femur:	13,0	15,3	19,0	19,8	21,8	24,8	25,3	24,7	26,9	24,3
Compr. da tibia:	14,3	16,9	19,8	19,8	23,9	27,3	27,3	30,4	29,8	26,3
Compr. do pé à ponta do 4° artelho:	20,5	23,3	27,0	28,0	33,6	37,0	38,5	39,2	41,0	38,5
Menor distancia entre as choanas:	2,5	3,0	3,2	3,0	4,0	4,3	5,0	5,5	5,0	4,7
Espaço entre as narina:	2,0	2,8	2,3	2,7	3,7	3,3	4,2	4,0	4,0	3,6
Dist. bordo ant. narina á ponta do focinho:	1,2	1,5	1,8	1,9	2,3	1,8	2,3	2,2	2,2	2,3
Dist. bordo post. calo carp. á ponta 3° dedo:	6,8	7,8	8,7	9,8	10,6	11,8	11,7	12,6	13,1	11,7
Dist. bordo post. narina ao bord. ant timpano:	7,8	9,3	10,2	11,1	12,8	13,5	15,0	16,0	16,2	14,6
Altura do timpano (transv.):	1,9	2,0	2,4	2,6	3,0	2,8	3,2	3,6	3,5	3,5
Larg. do timpano (longitud.):	1,6	1,8	2,2	2,5	2,4	2,5	2,5	3,3	3,2	2,9
Diametro ocular (longitud.):	3,8	4,0	4,9	5,0	6,2	5,5	6,0	6,8	6,7	6,5
Dist. bordo ant. olho à ponta do focinho:	5,4	5,8	6,7	6,9	7,8	8,4	9,4	10,0	10,2	9,0
Espaço interorbital anterior:	5,2	5,5	6,7	6,4	7,6	7,6	9,2	10,0	9,7	8,4
Sexo:	?	♂	♂	♂	♀	?	♀	♀	♀	♀

Mem. Inst. Butantan.
22:139-150, Nov.° 1950.

Hyla perpusilla Lutz e Lutz, 1939.
Adultes.

Ilha da Queimada Grande.
Vista geral.

Ilha da Queimada Grande.
Vista parcial.

Hyla perpusilla Lutz e Lutz, 1939.
Adultos vivos. Notar um casal em amplexo sexual.

Mem. Inst. Butantan,
22:127-138, Nov.° 1950.

Hyla perpusilla Lutz e Lutz, 1939.
Girinos. Fot. em 15-1[illegible]-1947.

Mem. Inst. Butantan,
22:151-172, Nov.º 1950.

NOTAS ERPETOLÓGICAS

7. *Fauna erpetológica da Ilha da Queimada Grande*

POR A. R. HOGE

(Da Secção de Ofiologia do Instituto Butantan. S. Paulo, Brasil)

INTRODUÇÃO

A primeira contribuição ao conhecimento da erpetofauna da ilha da Queimada Grande foi feita por Amaral nas Memórias do Instituto Butantan (Secção de Ofiologia)", na qual ele descreveu a espécie *B. insularis*. A segunda foi uma nota que publicamos em 1946, nas "Memorias do Instituto Butantan", na qual descrevemos uma nova espécie de Mabuya. *M. macrorhyncha*.

Depois da publicação desta nota voltamos mais tres vezes ao mesmo local acompanhados, então, pelo biologista A. Teixeira Leão e mais alguns serventes e técnicos do Instituto. Permanecemos cada vez cerca de 12 dias na Ilha.

MATERIAL

A coleção aqui estudada consiste em exemplares todos capturados durante as excursões acima mencionadas e compõem-se de duas espécies de ofídios, quatro de lacertílios, sendo que uma das serpentes e tres dos lacertilios são novos para esta ilha.

Como nas primeiras viagens conseguimos quase exclusivamente exemplares machos de *M. macrorhyncha,* resolvemos experimentar uma técnica de captura diferente à empregada anteriormente. A nova técnica consiste no seguinte: cercar com todo o pessoal disponível uma área de aproximadamente 20m de diâmetro e limpar o chão em volta; em seguida, sempre limpando o terreno, reduzir a área central onde os animais se refugiam. Quando a área central estiver reduzida a alguns metros quadrados; só uma pessoa continua limpando enquanto que as outras ficam ao redor para capturar os exemplares que tentam fugir para fóra do cêrco. Os exemplares são facilmente segurados no terreno descoberto onde não encontram esconderijo algum. Com esta técnica conseguimos capturar até 30 *Mabuya macrorhyncha,* 3 *Hemidactylus mabouia* e 1 *Dipsas* sp. num único cêrco de 20m de diametro.

Recebido para publicação em 20-5-1950.

O resultado foi que além de dar uma idéia mais exata sôbre a densidade das espécies, encontramos os dois sexos em perfeito equilíbrio numérico, o que não sucedeu com a técnica anterior onde se observou uma nítida predominância de machos.

O material capturado foi distribuido para o respectivo estudo, da seguinte maneira: *Anfibios*: A. Texeira Leão; *Aranhas e Escolopendras*: W. Buecherl; *Diplopodos*: O. Schubart. Todos, com excepção do último, do Instituto Butantan.

Cl. R E P T I L I A Laur. 1768

Ord. S Q U A M A T A Oppel, 1811

Subo. S A U R I A

Fam. **GECKONIDAE** Boul., 1883

Gen. **H e m i d a c t y l u s** Oken, 1817

Hemidactylus mabouia (Moreau de Jonnès, 1818)

Gecko mabouia Moreau de Jonnès — Bull. Soc. Philom. Paris **138**. 1818.
Hemidactylus mabouia Bianconi — Spec. zool. mosamb. Mém. Ac. Sci. Bologna **10**:499. 1859.
Hemidactylus mabouia Loveridge — Bull. Mus. Comp. zool. **98**:167, 1947.

Nenhum dos exemplares oferece características que os diferenciam dos exemplares procedentes do continente. A maioria foi capturada dentre das tufas de bromélias que desmanchavamos para a captura dos anfibios. Alguns foram encontrados nas fendas das rochas apenas alguns metros acima do nivel do mar e outros durante os cercos feitos para estimar a densidade das diferentes espécies de vida do chão.

Esta especie ainda não tinha sido registrada para a ilha da Queimada Grande (*).

Fam. **TEIDAE** Gray, 1827

Gen. **C o l o b o d a c t y l u s** Amaral, 1932

Colobodactylus taunayi Amaral, 1932

Colobodactylus taunayi Amaral — Mem. Inst. But. **7**:70. fig. 41-45. 1932

(*) Nas Mem. Inst. Butantan 19:241, 1946, assinalamos a ocorrência de um *Hemidactylus* sp. do qual não tinhamos conseguido capturar um exemplar. É esta espécie que agora determinamos como *H. mabouia*.

Capturamos 26 exemplares desta espécie sendo 8 machos. A espécie em aprêço era sómente conhecida pelos seus tipos e paratipos. Examinando os tipos que me foram cedidos para exame, por meu colega P. Vanzolini, do Departamento de Zoologia, notei que os de N.º 787 e 789 não eram *Colobodactylus*. Trata-se evidentemente de uma troca de número, pois os exemplares alem de pertencer a gênero diferente, têm dimensões completamente contrárias às mencionadas por Amaral. Talvez o meu colega, no decorrer da revisão que esta fazendo na coleção de lacertilios dos Dep. de Zool., encontre os exemplares perdidos.

O tipo é oriundo de Iguape, localidade situada no continente um pouco mais ao sul do que a Ilha da Queimada Grande.

Os exemplares da Ilha têm uma ou mais escamas intercaladas entre as gulares e ás vezes entre o segundo par de mentais; também a forma da frontal é ligeiramente diferente. Trata-se porém a meu ver de meras variações individuais que talvez sejam encontradas nos exemplares do continente quando se dispuzer de maior número de exemplares desta procedência.

Fam. **SCINCIDAE** Gray, 1825

Gen. **M a b u y a** Fitz., 1826

Mabuya macrorhyncha Hoge, 1946

Mabuya macrorhyncha Hoge — Mem. Inst. But. **19**:241, 1946.

Descrição do Alotipo: Uma fêmea N.º 927, na coleção do Instituto Butantan. Focinho ponteagudo; frenal anterior em contacto com a 2.ª labial; supranasais não em contacto por trás da rostral; frontonasal tão longa quanto larga em contacto com a frontal que é um pouco mais curta do que as fronto-parietais e interparietal juntos; prefrontais tão longas quanto largas, em contacto por trás da frontonasal; frontal em contacto com a 2.ª supraocular sómente; 4 supraoculares, a 1.ª menor e a 2.ª maior; 3.ª supraciliar maior; fronto-parietais em contacto por trás da interparietal; 2 pares de nucais; 7 supralabiais (5.ª menor).

Colorido como no holotipo.
Comprimento do corpo 62 mm
Comprimento da cauda 95 mm
Distância do olho até o focinho 6 mm
Membro posterior 22 mm
Membro anterior 16 mm
Comprimento da cabeça 11,6 mm
Largura da cabeça 8 mm

Redescrição de *Mabuya macrorhyncha* — Focinho alongado e ponteagudo; palpebra inferior com um disco transparente, não dividido; frenal anterior em contacto com a 1.ª e 2.ª (excepcionalmente com a 2.ª só.) supranasais largamente separadas; frontonasal tão longa quanto larga, em contacto ou não com a frontal; prefrontais tão longas quanto largas, geralmente separadas, excepcionalmente em contacto, separando a frontonasal da frontal; frontal um pouco mais curta do que as frontoparietais e interparietal juntas, em contacto sómente com a 2.ª supraocular; ás vezes a 1.ª supraocular está fundida com a 2.ª; 4 supraoculares; 4 ou 5 supraciliares iguais, ou 3.ª ou 4.ª maior; frontoparietais largamente em contacto, mais ou menos iguais em tamanho à interparietal; 2 pares de nucais (excepcionalmente 1 par); 7 a 8 supralabiais, 5.ª ou 6.ª maior; depressão auricular menor do que o olho, escamas em 28-30 series sendo as laterais um pouco menores; cauda cerca de 1,1 vezes mais longa do que o corpo mais a cabeça.

Comprimento máximo observado: 191 mm.

Coloração: Bronzeada em cima com uma lista lateral escura passando pelo olho e extendendo-se até a base da cauda, guarnecida por duas linhas claras marginais, sendo a inferior menos nítida.

A linha superior, por sua vez é orlada por uma lista escura que no meio do corpo é quase confluente com a do lado oposto. Parte ventral cinzento-oliva clara.

Fam. **AMPHISBAENIDAE**

Gen. **L e p o s t e r n o n** Wagler, 1824

Leposternon microcephalum Wagler — in Spix. Serp. Bras. Spec. Nov. **70**. fig. 1824.
Lepidosternon microcephalum Boulenger — Cit. Liz. Brit. Mus. :462.
Leposternon microcephalum Burt & Burt-Trans. Acad. Sci. St. Louis. **28**: 83. 1933.

Todos os exemplares capturados são tipicos.

Estando o Dr. Vanzolini fazendo uma revisão da Familia *Amphisbaenidae*, entregamos todo os exemplares, afim de poder estudar as possiveis variações.

Subord. S E R P E N T E S Lin. 1758

Fam. **DIPSADINAE** Amaral

Gen. **D i p s a s** Laur. 1768

Dipsas albifrons cavalheiroi subsp. n. (Fig. 13)

Descrição do Holotipo: N.º 11486 ♀, procedente da Ilha da Queimada Grande, capturada pelo autor.

Corpo grosso, levemente achatado lateralmente; olho grande, porem menor do que em *D. albifrons* (Sauvage); rostral tão larga quanto alta ou mais alta que larga, não visível de cima; sutura entre as inter-nasais menor do que o diâmetro do olho; frontal um pouco mais longa que larga, tão longa ou menor quanto à sua distância do focinho; menor que a sutura entre os parietais; supraocular mais larga posteriormente; loreal mais alta que longa, em contacto com as 2.ª, 3.ª e 4.ª supralabial; 2 postoculares do lado esquerdo, superior muito maior, 3 do lado direito, os dois inferiores minusculos; do lado esquerdo 1.ª temporal fundida com a 7.ª supralabial; do lado direito temporais 2-2; 8 supralabiais (4.ª e 5.ª entrando no olho); 12 infralabiais; 3 pares da infra-labiais em contacto por detrás da sinfisial; 3 pares de mentais, anterior mais longa do que larga; ventrais 159; subcaudais 77/77; anal simples; dorsais em 17-15-15 séries longitudinais, com a ponta arredondada, não lanciforme como em *D. albifrons albifrons*, (Fig. 14); série vertebral aumentada.

Coloração: marrom claro com faixas transversais levemente mais escuras do que a cor de fundo e pouco visíveis; ventre claro com umas leves nuvens marrom claro.

O pequeno numero de exemplares disponíveis não permite estudar as variações na folidose em relação com *D. albifrons*, porém parece que a nova espécie tem numero de ventrais e subcaudais menor do que a *D. albifrons*; em *D. albifrons cavalheiroi* as ventrais variam de 157 a 163 (♀) e as subcaudais entre 74 a 77 enquanto em *D. albifrons albifrons* as ventrais variam de 162 a 180 e as subcaudais 73 a 88 (♀).

Paratipos N.° 11.489, 11.487, 3468, 1638, 11.486.

Fam. **CROTALIDAE**

Subf. LACHESINAE

Gen. **T r i m e r e s u r u s**

Trimeresurus insularis (Amaral, 1921)

Lachesis insularis Amaral — An. Mem. Inst. But. (Ofiologia), 1:18-62, tabs. 3-4, 1921.
Bothrops insularis Amaral — Mem. Inst. But. 4:114 *et* 235, 1929.
Bothrops insularis Klauber — Bull. Zool. S. Diego 18: 1943.

Quase todos os exemplares foram capturados nas arvores onde elas ficam à espera dos passarinhos dos quais elas se alimentam.

A coloração muito clara da *T. insularis* muda rapidamente para o escuro quando transportada para S. Paulo.

Ord. T E S T U D I N A T A Oppel, 1811

Fam. **CHELONIDAE** Gray, 1825.

Gen. **C h e l o n i a** Brogniart, 1800

Chelonia mydas (L., 1758)

Testudo mydas Linnaeus — Syst. Nat. 1: 197, 1758.
Chelonia mydas Luederwaldt — Rev. Mus. Paul. 14:417, 1910.

Não capturamos exemplares, porém observamos muitos exemplares boiando na superfície ou imóveis pousados sobre os rochedos imersos á pouca distância da Ilha.

Gen. **C a r e t t a** Rafin. 1814.

Caretta caretta (L., 1758)

Testudo caretta Linnaeus — Syst. Nat. 1:197, 1758.
Caretta caretta Refinesque — Specchio. Sc. Palermo 2: (9) 66, 1814.

Também desta espécie observamos vários exemplares ao redor da ilha.

DADOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS

A ilha da Queimada Grande é um ilhote rochoso formado por rochas arqueanas, situado por L. 24 32 X 146 42 W. Greenwich ao largo da costa de São Paulo, Brasil. Dista aproximadamente 40 milhas do porto brasileiro de Santos. Ela é recoberta por densa mata e no NE encontra-se um grande capinzal literalmente infestado pelas *Mabuya* (Fig. 7 e 8). Existe um antigo bananal nas margens de um pequeno corrego que, porem, somente tem agua durante alguns dias depois de fortes chuvas. Atualmente a ilha é desabitada, sendo visitada apenas duas vezes por ano pelos encarregados do reabastecimento do farol automático mantido na ilha pelo Ministério da Marinha.

Antigamente tinha um faroleiro, porém, vários accidentes ofidicos e a impossibilidade dos moradores manterem animais domésticos devido ás picadas pela *T. insularis*, incitaram o Ministério da Marinha a transformar o farol em automático.

As águas ao redor da ilha, estando extremamente ricas em peixes comiveis de alta qualidade, são elas regularmente visitadas pelos pescadores, êstes porem raramente descem na ilha devido ao perigo e ao medo (ainda aumentado pelas lendas) que lhes inspiram as cobras.

A Queimada Grande é uma ilha continental, mesma formação geológica que a costa, separada por um mar de pequena profundidade, etc. Ela está situada na Zona AF. de Köppen ou seja tropical úmida com temperatura do mes mais quente superior a 22c e do mes mais frio maior do que 18c. A precipitação mensal maior de 60mm.

Não temos dados específicos sobre as condições climatológicas da ilha: porém notamos que muitas vezes chovia no continente e na ilha da Queimada Pequena, mais próxima do continente, enquanto que na Queimada Grande o ceu permanecia limpo.

Encontramos 6 espécies de repteis terrestres dos quais tres somente haviam sido assinalados até hoje *Trimeresurus insularis* Amaral, *Dipsas albifrons* Sauvage e *Mabuya macrorhyncha* Hoge. Examinando os exemplares de *D. albifrons* notamos, como já assinalamos, tratar-se não de *Dipsas albifrons* mas sim de uma subespécie nova.

A povoação da ilha deve ter origem em especimes da fauna continental que alcançaram acidentalmente a ilha. Todavia a grande diferenciação que encontramos parece indicar que a introdução já é bastante antiga. Convem notar que dos 6 répteis terrestres, somente tres ocorrem também no continente, sendo os outros tres restritos à ilha da Queimada Grande.

Hemidactylus mabouia: Esta espécie nitidamente de hábitos noturnos e, sem duvida, de introdução relativamente recente, talvez na epoca da instalação do Farol. Encontra-se com relativa abundancia nas tufas de bromélias e nas fendas das rochas, descendo até o nivel do mar; também capturamos muitos exemplares no chão durante os cercos feitos para estimar a densidade das populações.

Não se encontram juntas grandes quantidades de mabouia como acontece no continete onde se agrupa grande número na paredes iluminadas das habitações.

No continente ela se tornou antropófila devido ás facilidades de alimentação que a iluminação lhe proporciona.

É fóra de duvida que na ilha úa mudança para hábitos diurnos lhe teria sido favorável, porém esta mudança é fisiologicamente impossivel devido á grande vulnerabilidade aos raios dos solares dos representantes desta familia (existe uma espécie diurna, *Lygodactylus picturatus*, espécie esta provida de uma firtissima pigmentação peritoneal e neural, o que lhe permite resistir aos raios solares (Secerov).

O exame do conteúdo estomacal revela que *Hemidactylus mabouia* se alimenta de lepidopteros, ortopteros e alguns coleopteros. Em cativeiro ela eceita facilmente borboletas e baratas bem como larvas de Tenebrion.

Colobodactylus taunayi: Sem ser tão abundante quanto as *M. macrorhyncha* e *H. mabouia*, esta espécie foi porem encontrada em número relativamente grande. Até o momento esta espécie era conhecida somente pelos seus tipos. Desde 1932 nunca entrou um único exemplar nas coleções do instituto que, entretanto, recebe milhares de exemplares de répteis das mesmas regiões onde foram encontrados os tipos de *C. taunayi*. Fizemos até excursões com o fim de capturar topotipos, mas em vão.

Todos os exemplares foram encontrados durante os cercos. Não sabemos qual a alimentação. Em cativeiro aceitavam moscas e pequenas larvas do Tenebrion.

Mabuya macrorhyncha: Esta espécie é extremamente abundante e encontra-se principalmente no capinzal, existindo também no mato e nos rochedos, até o nivel do mar.

Trata-se, como as demais representantes do gênero, de uma espécie particularmente bem adaptada à vida ao sol, pigmentação forte da pele e pigmentação não menos importantes do peritônio e região neural.

Ela se alimenta de insectos os mais variados. Em cativeiro alimenta-se muito bem com moscas, larvas e adultos de Tenebrion.

Leposternon microcephalum. Todos os exemplares foram encontrados durante escavações, a uma profundidade de 10 a 60 cm.

Dipsas albifrons cavalheiroi. Esta espécie parece bastante rara. Encontra-se principalmente na mata ao redor do pequeno corrego. Todos os exemplares com excepção de um, foram capturados nas árvores onde em geral elas estão pousadas numa forquilha, não fazendo nenhum esforço para fugir. Somente quando irritada ela achata a cabeça e dá botes sem porém tentar morder.

Esta espécie como já se referiu Amaral, alimenta-se com lesmas (Vaginula?).

Trimeresurus insularis: E' uma *Crotalinae* com todas as caracteristicas de uma adaptação à vida noturna, porém as condições peculiares da vida na Ilha da Queimada Grande (ausência de mamíferos e outros animais noturnos) a obrigou a uma vida diurna sob pena de extinção.

O único alimento na ilha são os pequenos passarinhos que ali vivem em grande quantidade.

Geralmente a *insularis* é encontrada enrolada nos galhos das árvores, não na parte exposta ao sol, mas imediatamente em baixo das folhas. Desta maneira, além de estar mais ou menos protegida dos raios diretos ela fica invisível ao passarinho incauto que vem pousar nos galhos. Ela escolhe sempre árvores frutíferas. Quando há muito vento ela desce das arvores e se esconde nas fendas das rochas ou no pé das árvores. Na época da florescência das gramíneas ela é encontrada enrolada nas hastes d'estas últimas.

Todas as observações sobre a biologia desta cobra ja foram descritas por Amaral e por nós verificadas em várias ocasiões.

A presença de uma tendência a ter as subcaudais simples, indica uma ação da seleção natural, eliminando os exemplares menos aptos à vida arborícola?

A persistência das mutações foi sem dúvida devido a insulação que impossibilitou o cruzamento com especimens da costa. Talvez estes caracteres sejam recessivos que se manifestam pelas razões acima citadas.

Um fato digno de nota é que a *T. insularis* quando transportada para S. Paulo muda rapidamente de côr, ficando mais escura.

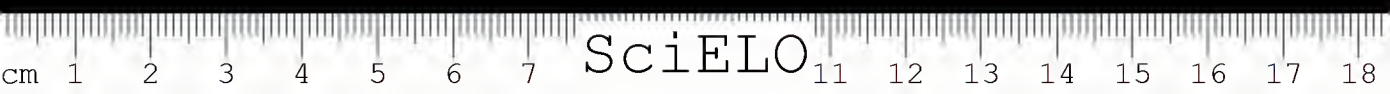
Mabuya macrorhyncha Hoge

Nº	Sexo	Corpo mm.	Cauda mm.	Nº	Sexo	Corpo mm.	Cauda mm.
832	♂	41	46	817	?	39	33
826	♀	63	5	1008	♀	58.5	41.5
834	♀	47	51.5	828	♀	65	.51
835	♀	31	18	824	♀	61	74
805	♂	64	60	818	♂	60	64
823	?	36.5	4	820	♀	60.5	43
809	♂	46	10	813	♀	61.5	53
981	♀	53	58	811	♀	64	71
822	♀	55	59	810	♀	59	42
821	♀	55	10	807	♂	49.5	50
804	♂	67	75	806	♀	60	14
808	♂	39	11	814	♂	48	12
819	♀	59	6	942	♂	40	37
830	?	32.5	2.5	829	♂	54.5	7
825	♀	61	67	1011	♀	60.5	70
831	?	37	42.5	827	♀	61	51
816	♀	57	7	815	♂	53	51
994	♂	60	6	833	♀	50	11
812	♂	62	63.5				

Nº	Sexo	Compr. corpo	Compr. total	compr. cabeça
1009	♂	51	110	9
957	♂	48	64	8,6
965	♂	57	147	9,7
1005	♂	49	119	9,1
1003	♂	50	129	9·1
	♂	47	151	8,3
1004	♂	43	112	7,8
964	♂	47	81	8,5
977	♀	56	177	9,1
1009	♀	45	117	8,0
960	♀	57	115	9,8
952	♀	48	115	8,5
961	♀	39	66	7,4
962	♀	45	111	8,4
1007	♀	58	155	9,3
958	♀	46	136	9,3
963	♀	57	131	9,6
950	♀	38	84	7·1
949	♀	42	80	7,7
951	♀	40	108	7,0
956	♀	34	99	6,2
954	♀	32	92	6,7
966	♀	36	120	6 5
953	♀	41	72	7,4
975	♀	52	172	9,2
955	♀	52	99	—

Dipsas albifrons cavalheiroi.

Procedência	Sexo	Capturado por	G	U	D	S. L.	I. L.	I. L. em contacto com a mental	A	
Ilha da Queimada Grande	♀	A. Hoge	159	17 15 15	77/77	8(4 e 5)	12	3	1	7ª fusionada com parietal 11.486 tipo
Ilha da Queimada Grande	♀	A. Hoge	163	17 15 15	77/71	8(4 e 5 8(5) e	11	3	1	11.487 paratipo
Ilha da Queimada Grande	♀	A. Hoge	159	17 15 15	74/74	8(5) e 8(5 e 6)	12	3	1	11.488
Ilha da Queimada Grande	♀	A. Hoge	157 %	17 15 15	50/50	8(4 e 5)	12	3	1	11.489

N°	Comp. total	Cauda	Corpo	N°	Comp. total	Cauda	Corpo
770	130	60	70	916	100	33 cm	67
791	191	122	69	917	161	99	62
794	67	8 cm	59	918	67	15 cm	52
836	165	99	66	919	167	102	65
837	125	57 cm	68	920	137	85	52
828	116	47 cm	69	921	131	87	44
839	177	113	64	922	161	98	63
840	124	79	63	923	95	45 cmr	50
841	82	15 cm	66	924	153	85	68
842	79	11 cm	68	925	165	96	69
843	178	110	68	926	155	95	60
844	75	12 cm	63	927	157	95	62
845	77	16 cm	61	928	100		
846	180	112	68	929	180	115	65
847	67	6 cm	61	930	160	97	63
848	99	39 cm	60	931	170	108	62
849	160	90	70	932	163	101	62
850	140	79	61	933	125	55	70
851	155	93	66	934	147	90 cm	57
852	159	95	70	935	165	95	70
853	165	8 cmr	72	936	78	28 cm	50
854	80	77	50	937	125	62	63
855	127	27	52	938	55	6 cm	59
856	79	41 cmr	64			100	53
857	105	99	68	940	94	27 cm	67
858	167	88	67	941	125	71	54
859	155	63	67	943	102	54	48
860	130	45	52	970	164	100	64
861	97	58	58	971	158	92	66
862	116	84	38	972	145	77	68
863	132	52	64	974	142	80	62
864	120	98	70	976	89	40 cm	49
865	168	53	52	978	167	98	69
866	105	1000	62	983	157	95	68
867	162	22 cm	55	985	163	35 cm	50
868	77	102	65	986	55	7 cmr	48
869	167	48	65	987	85	9 cm	63
870	113	18 cm	67	988	72	90	65
871	85	14 cmr	61	989	155	96	66
872	75	72	50	990	162	13 cm	67
873	122	82	66	991	80	81	58
874	148	50	64	995	139	97	53
875	114	62	59	996	160	47	48
876	121	104	65	997	95	73	72
877	169	67	113	998	145	105	67
878	180	106	70	999	172	29 cmr	66
879	176	110	66	1000	95	83	49
880	176	56	59	1002	132	12 cm	53
881	115	71	69	1913	65	90	65
882	140	104	64	1014	155	119	61
883	168	14 cm	51	1015	180	54	63
884	65	5 cm	70	1017	117	90	75
885	75	28	53	1018	165	15 cm	54
886	81	110	67	1019	69	61	62
887	177	39 cmr	71	1020	127	58	67
888	110	76	60	1021	125	10 cm	68
[illegible]	136	46 cm	69	1022	78	107	60
890	115	32	71	1023	167	98	76
891	103	15 cm	50	1025	165	25 cm	70
892	65	78	63	1026	95	100	61
893	158	71	67	1027	161	58	69
894	74	94	66	1028	127	99	61
		24 cm	58	1029	160	95	74
896	138	10 cm	72	1030	166	54 cm	71
897	160	80	51	1031	125	90	54
898	82	20 cm	65	1032	144	35 cm	65
899	82	65	60	1033	109	939	163
900	131	103	67				
901	85	110	64				
903	125	105	70				
904	170	65	64				
905	174	s.c.	60				
906	175	39	52				
907	129	95	20				
909	91	105	67				
910	115	80	69				
912	149	99	60				
911	172	106	67				
913	159	87	49				
914	137						
915	136						

RESUMO

O autor fez o estudo sistemático e ecológico dos Répteis da Queimada Grande.

Foram registrados 6 espécies de répteis terrestres e 2 marinhos.

3 espécies: *Hemidactylus mabouia, Colobodactylus taunayi* e *Leposternon microcephalus*, não tinham sido registrados ainda para esta ilha. O alotipo de *M. macrorhyncha* é descrito. *Dipsas albifrons cavalheiroi* subsp. n. é descrita.

ABSTRACT

A systematic and ecological study of a collection of reptiles from Queimada Grande Island is presented. Out of six different recorded reptile species, three are new for this Island. The *M. macrorhyncha* allotype is described. *Dipsas albifrons cavalheiroi* n. subsp. is described.

ZUSAMMENFASSUNG

Verfasser unternimmt ein systematisches und oekologisches Studium ueber die Reptilien der Insel "Queimada Grande". Es wird das Vorkommnen sechs terrestrer Reptilien und zweier marina auf dieser Insel aufgedeckt.

Die drei ersten Arten: *Hemidactylus mabouia, Colobodactylus taunayi* und *Leptosternum microcephalus*, wurden bisher fuer diese Insel noch nicht registriert.

Der alotipe von *M. macrorhyncha* wird beschrieben. *Dipsas albifrons cavalheiroi* n. subsp. wird beschrieben.

BIBLIOGRAFIA

1. *Amaral, A. do* — *Anexos dos Mem. do Inst. Butantan* (Ofiologia) 1, 1921
2. *Amaral, A. do* — *Mem. Inst. Butantan* 7, 1932.
3. *Amaral, A. do* — *Mem. Inst. Butantan* 4, 1929.
4. *Bianconi, J. J.* — Specimina zoologia mosambicana — *Mem. Accad. Sci. Inst. Bologna* 10, 1859.
5. *Boulenger, Georges Albert* — Description of new genus of Geckos — *Ann. and Magazine of Nat. History* 17, 1883.
6. *Boulenger, Georges Albert* — Catalogue of the lizards in the British Museum 1, 2, 3. 1885-1887.
7. *Boulenger, Georges Albert* — Catalogue of the Chelonians, Rhynchocephalians and Crocodiles in the British Museum, London. 1889.
8. *Boulenger, Georges Albert* — Catalogue of the snakes in the British Museum 3, 1896.
9. *Burt & Burt* — *Transactions of the Academy of Science of St. Louis* 28 (1 e 2). 1933.
10. *Fitzinger, Leopold I.* — Neue classification der Reptilien nach ihren natürlichen. Verwandtschaften, Wien, 1826.

11. *Haurwitz,Bernardt and Austin, James M.* — Climatology, New York, Mc Craw-Hell Book company, inc. 1944.
12. *Hesse, R. Allee U. C. and Schmidt, K. P.* — Ecological animal geography, 1937.
13. *Hoge, A. R.* — *Mem. Inst. Butantan* 19, 1946.
14. *Ihering, Rudolf von* — *Rev. Mus. Paul.* 8, 1910.
15. *Klauber, L. M.* — *Bulletin Zoological Soc. of S. Diego* 18, 1943.
16. *Köppen. Wladimir* — Das geographes System der Klimate, Berlin, Verlag gebr. Borntraeger, 1936.
17. *Kruga, Kem* — *Arch. Ges. Physiol.* 202:130, 1924.
18. *Laurentius, J. N.* — Specimen medicum exhibens synopsin reptilium emendatum cum experimentis circa venema et antidote reptilium austriaorum, Viennae, 1768.
19. *Linnaeus, Carolus* — *Systema Naturae* 1, 1758.
20. *Loveridge, Arthur* — *Bulletin of the Museum of Comportive Zoology of Horvard College* 98 (1), 1947.
21. *Luederwaldt,* — Rev. Mus. Paul. 14 e 19.
22. Mocquard — Etudes sur les Reptiles — *Mission scientifique au Mexique et dans l'Amerique Centrale* 2, 1908.
23. *Moreau de Jonnés* — Bull. Soc. Philom., Paris, 1818.
24. *Rafinesque,* — Specchio Sic (Palmero), 1814.
25. *Opel,* — *Ordn. Rept.* 3, 1811.
26. *Oken.* — *Isis*, 1817.
27. *Sauvage,* — *Bull. Soc. Philom.* 8 (7) ; 1884.
28. *Saecrov,* — *Archiv. Entw. Nechr.* 34:742-748, 1912
29. *Schweigger,* — Prodrome, 1894.
30. *Serebrenick, Salomão* — Mapa climatológico do Brasil, *Serv. d. Met., Minist. Agric.*, Rio de Janeiro, 1941.
31. *Setzer, José* — Contribuição para o estudo do clima do Estado de São Paulo — *Bol. D. E. R.*, São Paulo, 1946.
32. *Wagler, Jean* — *in Spix* — Serpentum Brasilientium specie novae Histoire naturelle des especes nouvelles de serpens recuillies et observées pendant le voyage dans l'interieur du Brésil dans les années 1917, 18, 19 20, — Monachii 1824.

Mem. Inst. Butantan,
22:151-172, Nov.° 1950.

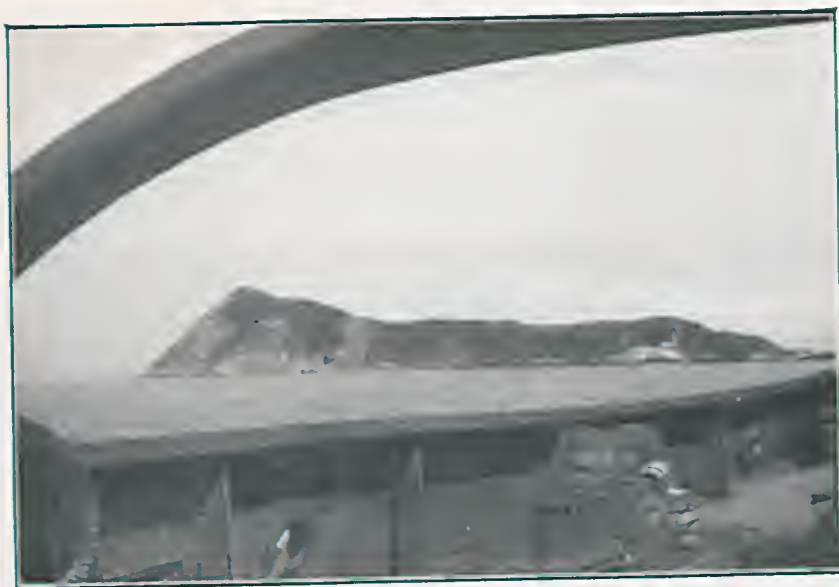



FIG. 1 e 2
Vista da Ilha Queimada Grande.

FIG. 3 e 4
Desembarque do material.

Mem. Inst. Butantan,
22:151-172, Nov.° 1950.

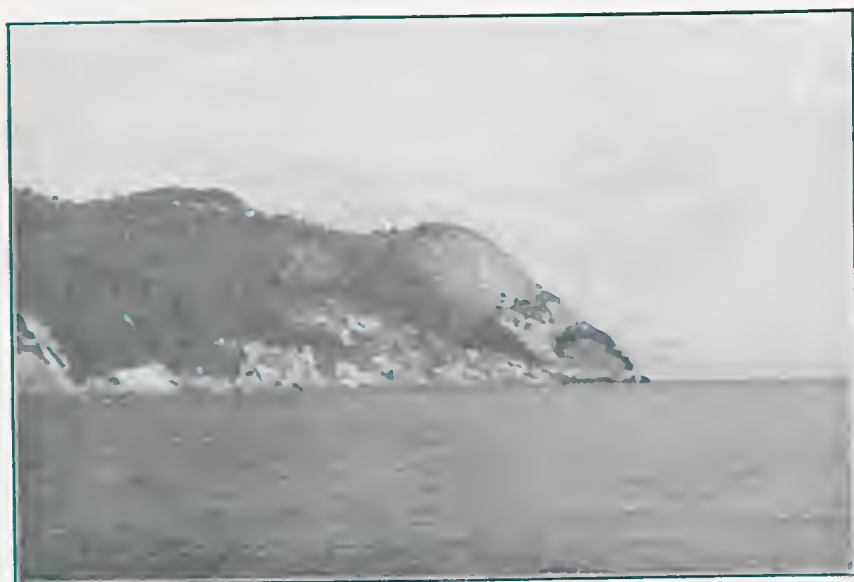



Fig. 5 e 6

FIG. 7 e 8
Vista parcial mostrando a disposião do capinzal e mata.

Mem. Inst. Butantan,
22:151-172, Nov.º 1950.

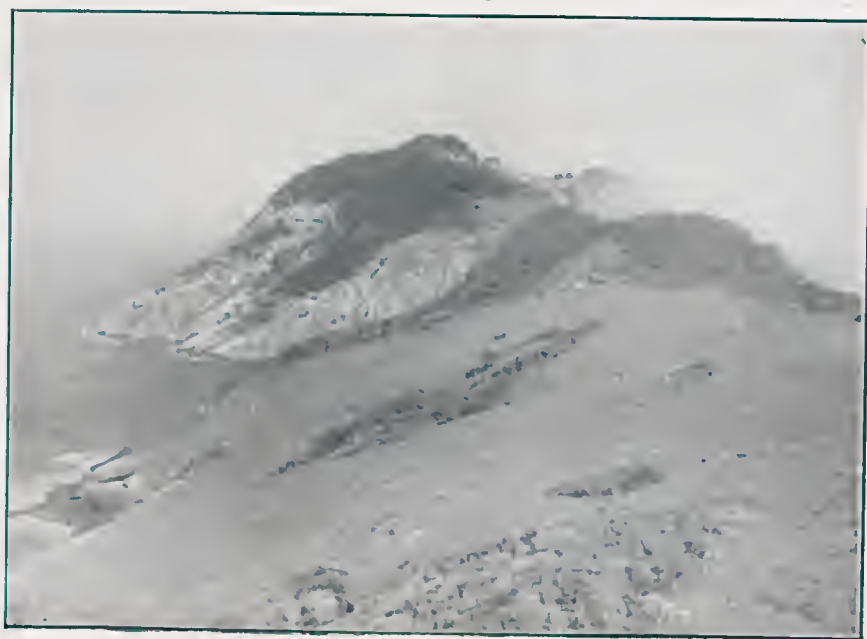



FIG. 9
Vista parcial da Ilha.

FIG. 10
Sula leucogaster chocando. Esta espécie é extremamente comum na Ilha e nem sequer foge quando dela nos aproximamos.

FIG. 11
Lote de *T. insularis* capturado numa única excursão de 10 dias.

FIG. 12
T. insularis no seu habitat.

Mem. Inst. Butantan.
22:151-172, Nov.° 1950.

Fig. 13
Tipo de *Dipsas albifrons cavalheiroi*.

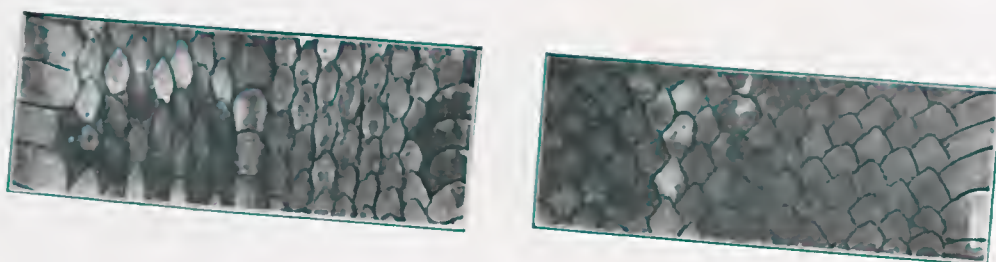
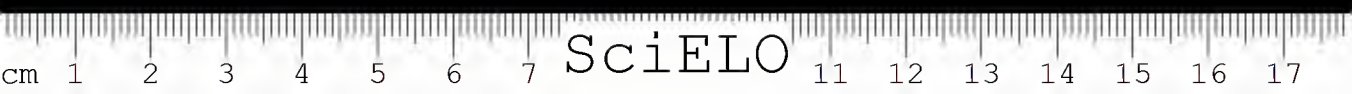



Fig. 14
a — dorsais de *Dipsas albifrons albifrons*.
b — dorsais de *Dipsas albifrons cavalheiroi*.

QUILÓPODOS DO PERU — II

POR WOLFGANG BÜCHERL

(Divisão de Zoologia Medica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Em 1942 recebemos, por intermédio de J. Sucoup, de Lima, Perú, 43 exemplares de Quilópodos, vindo este numero a constituir, então, o material mais copioso, jamais coletado de uma só vez naquele país.

Compõe-se esta coleção dos seguintes gêneros, espécie e sub-espécies:

1. *Scolopendra morsitans* L., 1758
   " *viridicorhis* Newp., 1844
   " " *nigra* Bücherl, 1939 e 1946
   " *arthrorhabdoides* Rib., 1944
   " *armata amancalis* Bücherl, 1943
   " *angulata* Newp., 1844.
2. *Cormocephalus bonaerius* Att., 1928
   " *impressus* Por., 1876
   " *andinus* (Krpln)., 1903.
3. *Rhoda calcarata* Pocock, 1891
4. *Otostigmus bürgeri* Att., 1903
   " *amazonae* Chamb., 1914.
5. *Rhysida celeris* (Humb. & Sauss)., 1914
6. *Otocryptops ferrugineus sucoupi* Bücherl, 1943.

Os locais de capturas eram, segundo J. Sucoup, apenas dois: — La Merced, numa altitude de 700 metros, onde foi encontrada a *S. morsitans*, e Amancais, nos arredores de Lima, numa altitude de apenas 300 metros, onde foram capturados todos os outros exemplares.

Trata-se, portanto, apenas de duas regiões muito restritas de Perú. O fato de se terem encontrado nestes pequenos areais Quilópodos de 6 gêneros diferentes com 13 espécies diversas, permite supôr que a fauna quilopódica do Perú deve ser assaz abundante e rica em diferentes espécies.

Entregue para publicação em 14 de Março de 1950.

Esta suposição é agora confirmada por uma nova coleção quilopódica de Perú, pequena em número, pois abrange apenas 25 exemplares, mas muito interessante quer sob o ponto de vista elucidativo da distribuição geográfica, quer sobre a capacidade de adaptação destes artrópodos aos mais diversos climas e ainda sobre a riqueza em espécies diferentes deste pequeno país.

O professor Wolfgang Weyrauch, a cuja gentileza devemos esta segunda coleção, a nós enviada para a determinação, em 20 de Agosto de 1949. Colecionou ele próoprio estes quilópodos, principalmente nos vales, nas encostas serranas e nos cumes das regiões andinas, desde 200 a 4.000 metros de altura, ora em floresta húmidas, ora em estepes áridas e altas, batidas por ventos frios.

Passamos agora a descrever esta nova coleção:

1. *Scolopendra gigantea weyrauchi*, subsp. n.

Colorido: Esternitos e pernas amarelos nos exemplares grandes, nos mais jovens (até 12 cm) os fémures, as tibias e os dois tarsos do último par de pernas muito verdes (em material conservado em álcool a côr é azul), destacando-se nitidamente do amarelo dos artículos das outras pernas e mesmo do prefémur e da parte basal do fémur do 21.º par. Antenas, placa cefálica, 1.º tergito, coxas das forcípulas e os últimos dois tergitos, inclusive o último prefémur e a porção basal do fémur côr de chocolate claro, bastante destacado do colorido dos outros tergitos, que apresentam um marrom "sujo", com a borda anterior geralmente bem enegrecida em cada tergito, como já foi descrito para *S. viridicornis nigra*.

Medidas: (Relação de 4 exemplares)

a) Últimas pernas tão longas ou por 2-3 mm mais longas do que as antenas.

b) Antenas extendendo-se até o 6.º tergito.

c) No 21.º par de pernas os prefémures tão longos quanto os dois tarsos, o fémur um pouco mais curto que o prefémur e a tibia mais curta que o fémur.

d) Medidas no exemplar — tipo: — comprimento (da placa cefálica até o último tergito) .... 122 mm; comprimento das antenas .... 34 e 32 mm; comprimento das últimas pernas .... 34 mm (prefemur-9; femur-8, 3; tibia-7; tarsos-9 mm).

(Os outros 3 exemplares ora são menores ora maiores, sendo constantes as relações mesurais).

Placa cefálica com finos poros esparsos e com dois leves sulcos longitudinais, levemente divergentes, indo até à base das antenas, mas interrompidos atrás, perto da margem posterior, onde são limitados por uma rede transversal de pequenos e leves sulcos (bem menores e mais delicados que em *S. viridicornis*).

Antenas geralmente com 17 artículos. Em muitos casos, entretanto, há num lado 17 ou 18, no outro 20 a 24 artículos (sob a lupa se vê, que neste caso se trata de uma anomalia, sendo os artículos muito pequenos). Os primeiros 5 ou 6 artículos basais se apresentam "nús", isto é, sem pêlos, pelo lado dorsal; ventralmente os pêlos já são visíveis a partir da porção apical do 3.º, 4.º ou 5.º artículo.

Placas dentárias um nada mais largas que longas; com 4 dentes em cada placa, sendo os três internos unidos num bloco, de maneira que apenas o 4.º dente lateral fica isolado. Sulcos basais das placas (vide fig.1), formando um ângulo de 110 graus, mais ou menos e continuados nos dois lados por outros sulcos que, entretanto, mal atingem o sulco transversal mediano. Este pode ser inteiriço ou mais fraco ou mesmo bipartido no meio. Adiante, no meio do coxosternum, um sulco longitudinal, leve, que atinge o meio das bases das placas dentarias mas que não se estende até o sulco horizontal. Portanto não há um ou 2 triângulos sulcais (vide fig. 1). Atrás dos dentes em bloco há em cada placa uma depressão oval, nela um tuberculo, do qual nasce uma curta cerda.

Penúltimo artículo do telopodito dos segundos maxilares com uma cerda robusta no canto apical interno e no mesmo canto, mas no último artículo, perto da garra e das duas garrinhas basais, mais uma apófise em forma de cerda cônica. "Escova" com pêlos não muito longos, não cobrindo as garras (vide fig.2).

1.º tergido com sulco anular em forma de fossa (vide fig.3) e com leves sulcos, partidos cada um em 2 ramos, dos quais os medianos ultrapassam levemente a fossa circular. 2.º tergito sem sulcos. 3.º tergito com dois sulcos leves, geralmente ramificados em frente e atrás. 4.º ao 20.º tergito com dois sulcos longitudinais paralelos, mais nitidos atrás e além disso no meio, perto da borda posterior mais um sulco muito curto. Carenas laterais do 5.º ao 21.º tergito. Este, na porção anterior, no meio, com saliência; quanto ao resto liso e com borda posterior redonda, mas saliente nos cantos.

Esternitos finamente pontuados; do 3.º ao 20.º com dois sulcos longitudinais paralelos, mais profundos no meio de cada placa, mas atingindo as duas margens.

21.º esternito mais longo que largo, com os lados divergentes e a borda posterior quase reta até fracamente bilobada. Perto desta uma leve depressão.

1º par de pernas com 1 esporão no prefemur, 1 no femur, 1 na tibia e 2 no primeiro tarso; do 2º ao 20º par de pernas apenas com 1 esporão tarsal. Todas as pernas com 2 garrinhas acessórias na base da garra terminal.

2º ao 18º (ou 17º) prefémur, no lado dorsal, apical com 3 pequenos espinhos justapostos (raras vezes falta um numa perna); 18º ou 19º com 4 pequenos espinhos no mesmo local; 20º com 4 a 5 espinhos no local, mas em cima de um pequeno prolapso e mais 1 pequeno espinho no meio do articulo, no lado dorsal.

Todos os fémures sem espinhos.

Apêndice do campo poroso das coxopleuras modicamente protraido, cônico, com 9 a 12 espinhos no topo; lateralmente geralmente com 1 espinho, raras vezes nenhum, algumas vezes 3-4 espinhos; dorsalmente, perto do canto do tergito sempre com 1 espinho e muitas vezes com mais 1 ou 2 do lado (vide fig. 4).

Prefémur das últimas pernas com 24 a 28 espinhos, distribuidos irregularmente pelas áreas dorsal, mediana e ventral. No lado ventral os espinhos deixam livre mais ou menos um terço apical. Fémur sem espinhos. Espinho do canto ("Eckdorn") com 6 a 8 espinhos.

A presente subespécie é afim das seguintes espécies e subespécies: — *S. arthrorhabdoides, armata, armata amancalis, gigantea, angulata, angulata explorans* e *angulata moojeni* e o grupo de *viridicornis*.

S. arthrorhabdoides não tem quase sulco longitudinal mediano no coxosternum forcipular; a fossa circular no 1.º tergito é praticamente ausente; somente seu 21º tergito apresenta carenas laterais; não tem espinhos no dorso dos prefémures.

S. armata armata Krpln. não apresenta sulco longitudinal mediano no coxosternum forcipular; não tem carenas laterais a não ser nos 3 últimos tergitos; nos esternitos da metade anterior do tronco os dois sulcos são muito leves e curtos; não apresenta espinhos no lado dorsal dos prefémures; o apêndice do campo poroso das coxopleuras apresenta apenas 1 a 3 pontas.

S. armata amancalis também não apresenta o sulco longitudinal mediano do coxosternum das forcípulas; os dois sulcos do 1º tergito são apenas curtos e simples, sem serem bipartidos e sem atingirem a fossa circular. Os sulcos dos tergitos são muito leves; não há o curto sulco mediano na borda posterior dos tergitos.

S. gigantea gigantea L. tem 9 a 12 articulos basais das antenas desprovidos de pêlos; tem um triangulo sulcal no coxosternum das forcipulas. Apenas dois dentes estão unidos num bloco e os dois laterais isolados; nos fémures,

principalmente das pernas posteriores, há geralmente um pequeno espinho apical, no lado dorsal.

Por outro lado, porém, apresenta a nova subespécie muitos característicos iguais à *S. gigantea*, de maneira que não pode haver dúvida de que se trate realmente de uma subespécie desta.

As duas apresentam os mesmos sulcos longitudinais e o sulco curto, mediano, nos tergitos, como também as mesmas carenas laterais. Nas duas o último tergito é elevado em frente, sem que haja uma formação de quilha propriamente. Em ambas os sulcos dos esternitos são aprofundados no meio e o lado dorsal, apical, dos prefêmures de ambos está dotado de numerosos espinhos (geralmente 3).

Enquanto que estas semelhanças morfológicas indicam claramente a *S. gigantea* para os novos exemplares, justificam, contudo, as particularidades invariáveis, uma subespécie nova, ainda mais porque a *gigantea gigantea* L. diverge igualmente no colorido, principalmente dos tarsos das últimas pernas, bem verdes nesta subespécie, sempre amarelos em *gigantea gigantea*.

Tipo: — Nº 10.035, da coleção do prof. Wolfgang Weyrauch, Lima, Perú. Fêmea.

Local-tipo: — Pucará, perto de Jaen, N. Perú. Uma zona de estepe, seca e quente, de quase 900 metros de altura.

Paratipos: — N.º 590, da coleção quilopódica do Instituto Butantan, macho e N.º 591, fêmea, adolescens, procedentes do monte Campana, de 300 metros de altura, situado perto de Trujillo.

N.º 592, fêmea, de Tambo Tingo, acima de Chilete, numa altura de 1.500 metros, entre Pacasmayo e Cajamarca, na descida ocidental dos Andes.

2. *Cormocephalus (C.) andinus rubrifrons*, subsp. nova

Cabeça, primeiro tergito e coxosternum e às vezes também as últimas pernas marrom escuro, nitidamente destacado do resto do tronco que se apresenta num oliváceo amarelo, mais claro ou escuro.

Antenas sempre com 17 artículos, dos quais os 6 basais estão sempre desprovidos de pêlos, que começam abruptamente do sétimo em diante e apresentam um amarelo brilhante. (Fig. 5).

Comprimento até 90 mm. Placa cefálica tão longa quão larga, com dois sulcos longitudinais muito divergentes (fig. 5). Duas placas basais bem visíveis. Os dois sulcos longitudinais vão até a altura dos olhos nos exemplares adultos, enquanto que nos filhotes somente atingem a metade posterior da placa.

Primeiro tergito encobrindo parcialmente as placas basais. Tergitos 1 a 20 com dois sulcos longitudinais paralelos, ligeiramente interrompidos na frente no 1º tergito; nos restantes completos. No 2º tergito um dos sulcos é geralmente bipartido na frente (fig. 5). Carenas laterais visiveis já fracamente desde o 8º ao 10º tergito, na metade anterior; melhor pronunciadas nos 3 tergitos seguintes e mais ou menos completas desde o 15º tergito. Entre estes sulcos paramedianos há uma ligeira saliência mediara e, nos dois lados desta, uma depressão — tudo muito pouco nítido, mas mesmo assim constantemente perceptivel. 21º tergito bem mais largo que longo (fig. 6), bem carenado lateralmente e com borda posterior bem protraida no meio; com sulco mediano longitudinal (fig. 6).

Coxosternum do telopodito forcipular (fig. 7) com dois sulcos longitudinais, convergentes em frente, encontrando-se quase na base das placas dentárias e abrindo-se na zona posterior do coxosternum. Atravessadas horizontalmente na frente por um sulco que é dissolvido em diversos ramos horizontais (fig. 7). Placas dentárias mais longas que largas, com tres dentes isolados cada uma, sendo o interno sempre o mais robusto.

Esternitos 2-20 com dois sulcos paramedianos e no meio destes uma depressão oval anterior e u'a menor e mais rasa posterior; a última nem sempre bem visivel em todos os esternitos.

21º esternito com bordas laterais e posterior arredondadas e com longa depressão longitudinal no meio (fig. 8).

Coxopleuras com apêndice posterior bem saliente, cilíndrico, terminando em dois pequenos espinhos (fig. 8). Sem espinhos laterais. Campo poroso não atingindo a borda do tergito.

Prefémures das últimas pernas com 2 pequenos espinhos na zona apical interna, mas sem saliência, e mais um espinho menor na área medial. Ventralmente 3 fileiras com 2 espinhos cada uma (fig. 8). Prefémur, fémur e tibia aproximadamente do mesmo comprimento. Os tres no lado dorsal, na linha mediana, um profundo sulco em forma de fossa (fig. 6). Tarso 1 da metade do comprimento da tibia e o segundo tarso ainda um pouco mais curto do que o primeiro. Garra terminal tão longa quanto os 2 tarsos juntos; no lado interno comprimido em fio laminado; sem garrinhas laterais. Todos os tarsos das pernas sem esporão mas com 2 pequenas garrinhas ao lado da garra terminal.

Tipo: Nº 10.025 da coleção do prof. Wolfgang Weyrauch, Lima, Perú. Fêmea.

Local-tipo: Huanuco, numa altura de 1.900 metros, Perú.

Paratipos: Um macho e uma fêmea, sob Nº 593 do coleção quilopódica do Instituto Butantan, procedentes do local-típico.

Uma fêmea, sob Nº 594 da coleção quilopódica do Instituto Butanta, procedente de Acancay, Perú; capturada pelo Prof. Wolfgang Weyrauch numa zona árida, quase sem vegetação, numa altura de 2.500 metros.
Um macho, sob N.º 595 da coleção do Instituto Butantan, capturado por W. Weyrauch em Sahuayaco, no vale Urubamba, com 800 metros de altitude, em zona seca, quente, pobre em vegetação.

Este exemplar apresenta já bifurcação dos dois sulcos longitudinais, paramedianos, do 1º e 2º tergito e mesmo os sulcos da placa cefálica são um tanto irregulares, com malhas.
Nº 10.037, da coleção do prof. Wolfgang Weyrauch. Um exemplar jovem, capturado em Tingo Maria, ao longo do rio Huallaga, numa altitude de 670 metros.

3. *Cormocephalus (C.) impressus* var. *neglectus* (Chamb.), 1914

Trata-se de um único exemplar, semi-adulto, infelizmente não muito bem conservado. Mesmo assim as partes morfológicas, especificamente importantes, permitem enquadrar perfeitamente este exemplar no grupo de *C. impressus*, isto é, 4 + 4 dentes nas placas dentárias; ápice do campo poroso das placas coxopleurais do último segmento do corpo sem apêndice protraído, mas apenas com dois espinhos diminutissimos. Campo poroso relativamente pequeno, não atingindo a margem superior. Última perna com prefemur, femur e tíbia dorsalmente sulcados; a garra terminal ventralmente em lâmina, quase tão longa quanto os dois tarsos juntos; prefemur com espinhos diminutissimos, dois no local do "espinho do canto" e um mediano, dorsal e mais 5 a 6 ventralmente em 3 filas mal pronunciadas. Os sulcos do coxosternum forcipular, entretanto, divergem um tanto, isto é, os dois sulcos longitudinais e o transversal estão tão abreviados que existe apenas o triângulo central, sem os ramos laterais. Todo o resto coincide com a variedade *C. impressus neglectus*.

Exemplar, fêmea, Nº 10.130 da coleção do prof. Wolfgang Weyrauch, Lima, Perú, capturado em Divisoria, na Cordilleira Azul, numa altitude de 1.500 metros, em mata subtropical, húmida.

4. *Cormocephalus impressus glabrus*, subsp. n.

Colorido: Todo o corpo marrom oliváceo; esternitos, pernas e antenas amarelos. Sem faixa mais clara no meio das placas dorsais (*impressus impressus*).

Comprimento do exemplar tipico até 56 mm. Placa cefálica 3 mm de comprimento por 2.5 mm de largura. Prefémur e fémur das últimas pernas do mesmo comprimento; tíbia um pouco mais curta do que o femur; 2º tarso um pouco mais curto do que o 1º e os dois tarsos juntos ainda um nada mais

curtos do que a tíbia. Última garra apenas um pouco mais curta do que os dois tarsos juntos.

Placa cefálica pontuada, com 2 sulcos longitudinais, muito divergentes na frente, mas que não vão além da metade posterior. Antenas com 17 artículos, dos quais os 7 basais apresentam apenas pêlos muito esparsos, enquanto que os restantes estão dotados de abundantes pelinhos curtos. Coxosternum forcipular (vide fig. 9) sem sulcos longitudinais ou transversais (em *impressus impressus* há dois sulcos longitudinais completos, convergentes na base das placas dentárias em ângulo agudo e atravessados por um sulco horizontal muito nitido). Placas dentárias tão longas quanto largas, com 4 dentes cada uma, sendo os dentes internos parcialmente unidos (fig. 9). Tergitos 1 a 20 com dois sulcos longitudinais paramedianos e no meio deles uma elevação longitudinal muito leve e mal perceptível. 21° tergito com sulco mediano. Carenas laterais dos tergitos completas e bem feitas apenas no último tergito; nos 5 a 7 tergitos precedentes apenas bordas elevadas, a maneira de carenas, mas existentes somente na primeira metade dos tergitos, não atingindo nunca a margem posterior. (Em *impressus impressus* as carenas laterais já estão presentes desde o 9° ou 10° tergito).

Esternitos 2-20 com 2 sulcos longitudinais completos, mas sem depressão mediana anterior, como em *impressus impressus*. 21° esternito com depressão longitudinal mediana e com borda posterior truncada.

Coxopleuras do último segmento arredondados atrás; sem apófise, mas em seu logar dois espinhos pequenissimos. Sem outros espinhos. Área porosa não atingindo a margem superior.

Todas as pernas sem esporão tarsal. 1° tarso sempre bem mais longo que o 2°. Prefemures do 21° par de pernas com 2 pequenos espinhos no canto posterior, medial, superior, no local do "espinho do canto" que aqui não é formado e apenas mais um espinho, pequenissimo, na area mediana superior. Ventralmente 3 fileiras com 2 espinhos pequenissimos cada. Preféinur, fémur e tíbia, no lado superior, apical, com profunda fossa. Garra terminal ventralmente em forma de lâmina.

Tipo: N.° 10.128 da Coleção do prof. Wolfgang Weyrauch.

Local-tipo: San Mateo (Rio Rimac), nas encostas ocidentais dos Andes. Coletado pelo prof. W. Weyrauch, numa altura de 3.000 metros.

5. *Otostigmus rex* Chamberlin, 1914

N° 10.030 da coleção do prof. W. Weyrauch. Fêmea, por ele coletada nos arredores de Tingo Maria, ao longo do rio Huallaga, numa altitude de 670 metros.

6. *Otostigmus pococki* Kräpelin, 1903

5 exemplares ao todo: — Nº 10.129 da coleção do prof. W. Weyrauch, coletado em Divisória. na parte central da Cordilheira Azul, numa altitude de 1.500 metros.

Nº 596 da Coleção quilopódica do Instituto Butantan, procedente de Acomayo, perto de Huanuco, colhido pelo prof. W. Weyrauch numa altitude de 2.700 metros.

Nº 597 da coleção quilopódica do Instituto Butantan, com a mesma procedência e o mesmo colecionador do exemplar precedente.

Nº 598 da coleção quilopódica do Instituto Butantan, procedente de Huanuco, duma altitude de 1.900 mertos.

Nº 599 da coleção quilopódica do Instituto Butantan, procedente de Tingo Maria, ao longo do rio Huallaga, com 670 metros de altitude.

Os exemplares apresentam os seguintes caracteristicos morfologicos, não mencionados pelo autor da espécie: — 2 esporões tarsais nos primeiros 6 pares de pernas e não apenas no 1º; tergitos da segunda metade do tronco além das 5 quílias rugosas, longitudinais, mais duas laterais, acessórias; sulcos basais das placas dentárias em ângulo obtuso e na área uma profunda e curta depressão mediana; esternitos sem sulcos; em logar das 3 depressões anteriores existe apenas u'a maior, mesmo já nas placas anteriores.

7. *Otostigmus amazonae* Chamberlin, 1914

Nº 10.039 da coleção do prof. Wolfgang Weyrauch, colhido numa altitude de 3.800 metros, acima de Chincheros, perto do rio Pampas, nos arredores de Andahuaylas, Perú.

Nº 10.127 da coleção do prof. W. Weyrauch, colhido em Machupicchu, ao longo do rio Urubamba, nos arredores de Cuzco, numa altitude de 2.100 metros.

Nº 600 da coleção quilopódica do Instituto Butantan, com 7 exemplares, machos e fêmeas, colhidos pelo prof. W. Weyrauch em Atocongo, perto de Lima, numa altitude de 200 a 500 metros.

8. *Rhysida celeris* (Humb. & Sauss.), 1870

Nº 10.028 da coleção do prof. Wolfgang Weyrauch, coletado perto de Tingo Maria, ao longo do rio Huallaga, numa altitude de 670 metros, Perú. Fêmea.

9. *Cryptops (T.) debilis*, sp. n.

Todo o corpo amarelo avermelhado, prevalecendo o vermelho na cabeça e no 1º segmento. Comprimento até 45 mm. Placa cefálica aproximadamente

tão longa quanto larga. Preíémur e fémur das últimas pernas de igual comprimento; tibia mais curta que o fémur; tarso 1 um nada mais curto que a tibia. Todo o corpo esparsamente pontuado. Placa cefálica com 2 sulcos longitudinais, divergentes, muito nítidos e percorrendo a placa toda (fig. 10). A mesma placa cefálica encobrindo completamente a fossa circular do primeiro tergito (Na fig. 10 a placa cefálica foi desenhada de tal maneira que se pode ver a fossa). Margem anterior do coxosternum forcipular bilobada; apenas com cerdas robustas tanto nestas margens como na área da placa. Sem espinhos. Antenas com 17 articulos, dos quais os dois basais apresentam cerdas grossas, pouco numerosas, enquanto que as mesmas nos articulus seguintes são mais numerosas e mais finas (fig. 10). Primeiro tergito com fossa circular e dois sulcos longitudinais, que se estendem justamente até a fossa (Fig. 10). Todos os tergitos seguintes, inclusive o vigesimo, com 2 sulcos longitudinais paramedianos e do 3º ao 19º, além disso, dois sulcos laterais, anteriores. Último tergito com depressão longitudinal mediana e lateralmente liso, sem tubérculos. Esternitos (fig. 11) 1 a 19 com um sulco longitudinal mediano e um transversal, formando os dois a configuração de uma cruz, com as hastes transversais um pouco suspensas. Nos esternitos da primeira metade do tronco, além disso, 3 triângulos posteriores (fig. 11), formados pelos sulcos e rebordos do endo-esternito. 21º esternito sem sulco nem depressão, com borda posterior arredondada; mais largo que longo. Coxopleuras de campo poroso muito pequeno, ocupando os poros apenas um terço da área total; com algumas cerdas curtas no permeio. Posteriormente redondos, nada protraidos.

Todos os tarsos das pernas bi-articulados. Últimas pernas (fig. 12) com cerdas e espículas no preíémur, fémur e na tibia; nos tarsos somente cerdas.

Até agora tem sido descrita para toda a America do Sul apenas uma única espécie do subgênero *Trigonocryptops*, a *Cryptops iheringi* Brölemann, 1902, com habitat ao longo da Serra do Mar, a começar desde Petrópolis até Paraná, Brasil.

Em vista disto, nos aventuramos à descrição da espécie *C. debilis*, ainda que possuindo apenas um único exemplar.

Tipo: 10.044 da coleção do prof. Wolfgang Weyrauch, Lima, Perú.

Local-típico: Arredores de Abancaí, nos Andes, em zona de estepe pobre em vegetação e numa altitude de 4.000 metros.

10. *Otocryptops ferrugineus sucoupi* Bücherl, 1943

Nº 10.043 da coleção do prof. Wolfgang Weyrauch, colhido numa altitude de 3.200 metros, nos arredores de Huancayo, Perú.

Nº 601 da coleção quilopódica do Instituto Butantan, colhido pelo prof. Wolfgang Weyrauch numa altitude de 3.400 metros numa zona de estepe bem

acima de Celendin (N. Perú) e um segundo exemplar, N° 602, colhido ao longo do rio Chinchipe, perto de San Ignacio, numa altitude de 800 metros.

11. *Newportia longitarsis longitarsis* (Newp. 1845)

N° 10.032, da coleção do prof. W. Weyrauch, colhido perto de Tingo Maria, numa altitude de 670 metros, Perú.

N° 603, da coleção quilopódica do Instituto Butantan, colhido pelo prof. W. Weyrauch, em Huanuco, numa altitude de 1.900 metros, Perú.

Ambos estes exemplares apresentam alguns caracteres diferenciais de *N. l. longitarsis*, como a ausência completa de sulcos longitudinais na placa cefálica. No exemplar de Tingo Maria os dois sulcos longitudinais do primeiro tergito vão apenas até a fossa circular, enquanto que no segundo exemplar se estendem ainda além da mesma, como em *l. longitarsis*. Nos esternitos de ambos há apenas um sulco mediano, mas não os dois curtos posteriores de *l. longitarsis*. Os sulcos paramedianos dos tergitos existem desde o 2° até o 22° tergito, mas os dois laterais anteriores se apresentam no exemplar N° 603 já desde o 3°, indo apenas até o 19° e no exemplar de Tingo Maria só existem desde o 10° até o 20°. Nos dois exemplares de Perú o prefémur, fémur e a tibia do último par de pernas apresentam aproximadamente o mesmo comprimento. O prefémur termina em lâmina no lado ventral, apresentando 4 dentes relativamente grandes; o fémur tem 3 a 4 dentículos muito pequenos no lado medial e a tibia ostenta no lado apical, ventralmente, uma pequena apófise, dotada de um espinho robusto.

CONCLUSÃO

As duas pequenas coleções de Quilópodos, uma enviada ao Instituto Butantan pelo prof. Sucoup, de Lima, Perú, em 1942, e, a segunda, provinda do prof. Wolfgang Weyrauch, igualmente de Lima, e enviada para o Instituto Butantan para a determinação dos exemplares, em 1949, revelam, enquanto for licito prejulgar à mão de material relativamente pouco numeroso (68 exemplares ao total), que a fauna quilopódica do Perú não é tão pobre em espécies.

No gênero *Scolopendra* são assinaladas para aquele país as seguintes espécies: — *morsitans, viridicornis, arthrorhabdoides, armata, angulata* e *gigantea*.

No gênero *Cormocephalus* existem as espécies *bonaerius, impressus, andinus* com algumas subespécies.

O gênero *Rhoda* apresenta a espécie *calcarata*.

Otostigmus está desdobrado nas seguintes espécies: — *bürgeri, amazonae, rex* e *pococki*.

Rhysida celeris foi igualmente encontrada nas duas coleções.

Completamente nova para o Perú é a espécie *debilis*, subgênero *Trigonocryptops*, havendo em toda a America do Sul apenas um outro representante único do gênero, o *C. iheringi*.

Finalmente foi acentuada ainda a existência do gênero *Otocryptops* com a espécie *O. ferrugineus*.

RESUMO

O presente trabalho se ocupa da fauna quilopódica de Perú, referindo em ordem sistemática as espécies e subespécies encontradas numa coleção coletada na região montanhosa dos Andes pelo prof. Wolfgang Weyrauch e enviada pelo mesmo ao Instituto Butantan, para a respectiva classificação. Foram encontradas as seguintes novidades sistemáticas:

Scolopendra gigantea weyrauchi, subsp. n.
Cormocephalus andinus rubrifrons, subsp. n.
Cormocephalus impressus glabrus, subsp. n.
Cryptops debilis, sp. n.

ZUSAMMENFASSUNG

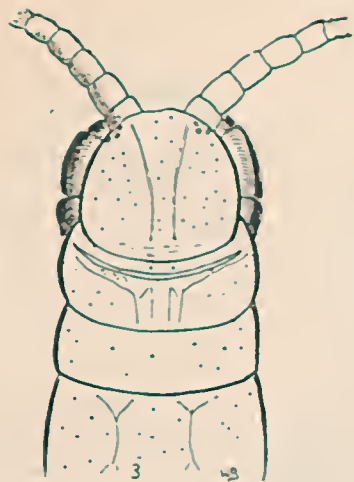
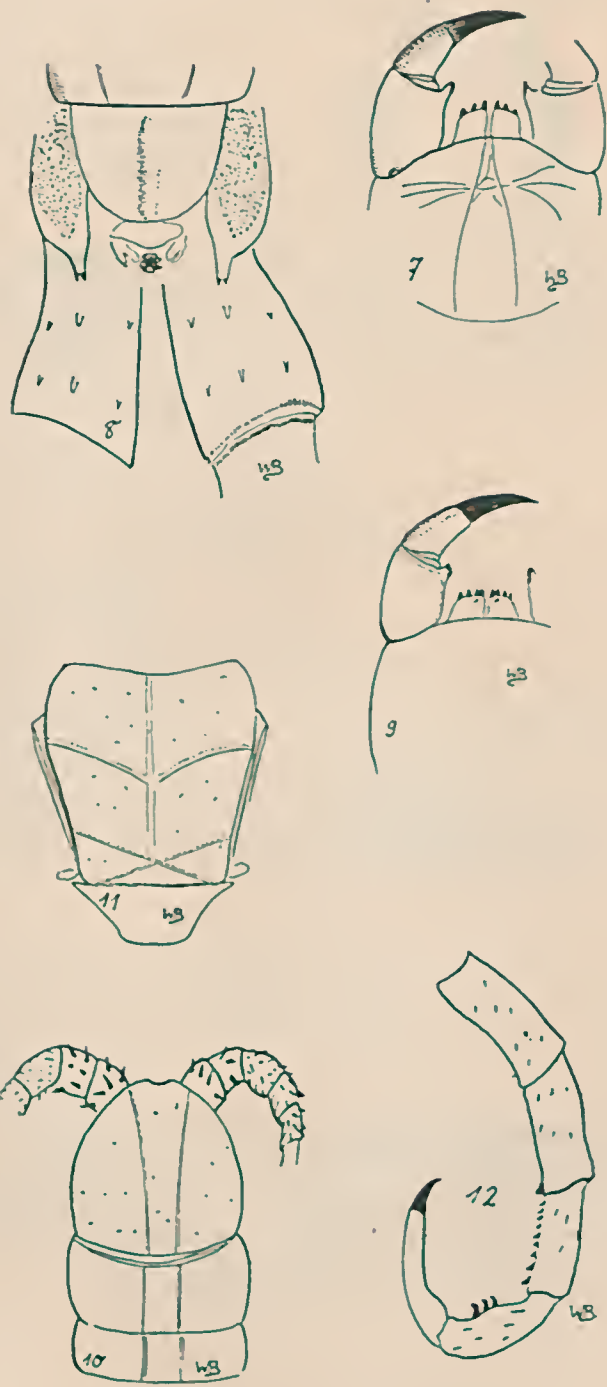
Im Anschluss an die Chilopoden, die ich 1942 durch H. Prof. Sucoup, aus Lima, Perú, erhielt, kann ich nun einen zweiten Aufsatz über peruanische Chilopoden folgen lassen, da H. Prof. Wolfgang Weyrauch mir seine, 1949, im Andengebiete Perus gesammelten Chilopoden, zur Bestimmung übersandte. Unter dem letzteren Material befinden sich folgende Neuheiten in systematischer Hinsicht:

Scolopendra gigantea weyrauchi, subsp. n.
Cormocephalus andinus rubrifrons, subsp. n.
Cormocephalus impressus glabrus, subsp. n.
Cryptops debilis, sp. n.

Unter dem anderen, durch meinen ersten Aufsatz aus Peru schon bekannten Material, befinden sich folgende: *S. morsitans, gigantea, viridicornis, arthrorhabdoides, armata, angulata; C. bonaerius; Rhoda calcarata; Otostigmus bürgeri, amazonae, rex* und *pococki; Rhysida celeris; Otocryptops ferrugineus.*

Mem. Inst. Butantan,
22:173-186, Nov.° 1950.

7
8
9
10
11
12

Mem. Inst. Butantan,
22:187-198, Nov.° 1950.

QUILÓPODOS DA VENEZUELA (I)

POR WOLFGANG BÜCHERL

(Trabalho da Divisão de Zoologia Medica do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

Pelos fins do ano de 1949 nos foi enviada uma pequena coleção de quilópodos, coletados pelo prof. Dr. G. Marcuzzi, da Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Físicas e Matemáticas, de Caracas. Estes quilópodos são descritos neste trabalho.

Ordem: — S C U T I G E R O M O R P H A

Fam.: — *P S E L L I O P H O R I D A E*

Genus: — *Brasilophora* Bücherl, 1939

1. *Brasilophora trimarmorata*, sp. n.

Colorido: — Cabeça e tergitos com larga faixa mediana, amarela, reta, a percorrer todas as placas dorsais até a borda posterior do último tergito. Na área posterior da cabeça ela se trifurca, indo os dois ramos laterais em direção aos olhos, onde terminam nas bordas internas dos mesmos, enquanto que a faixa mediana, mais larga, vem a terminar na fronte.

Ao lado das carenas laterais dos tergitos, nos dois cantos redondos anteriores, existe igualmente u'a mancha amarela.

Todo o resto, tanto da cabeça como dos tergitos, é marrom escuro. Também as bordas externas dos estigmas, que se localizam no meio da faixa amarela, apresentam tonalidades escuras.

Área superior dos pleuritos, entre os tergitos e as coxas das pernas igualmente marrom, com u'a mancha circular amarela, no meio. Coxas e esternitos amarelos, com as saliências e bordas em faixas enegrecidas.

Prefêmures das pernas marrons, mas com *tres* grandes manchas amarelas, uma no começo, uma no meio e uma no fim do artículo. Fêmures igualmente

Entregue para publicação em 13 de abril de 1950.

com estas tres manchas (daí o nome "*trimarmorata*") amarelas em fundo marrom, sendo a mancha apical bem menor; tibias marrons, tendo apenas u'a mancha amarela no ápice. Tarsos marrom claro.

Medidas: — comprimento (desde a fronte até a borda do fim do tronco): 34 mm.

Antenas: — acima de 80 mm, tendo o flagellum primum 21 mm.

Últimas pernas: — femur — 9,5 mm; tibia — 12,5 mm; tarso — 23,5 mm; 2º tarso perto de 80 mm. Total: — perto de 120 mm.

Flagellum primum com 54 a 58 artículos; todos bem mais longos do que largos, cobertos de numerosas cerdas, não dispostas em coroas. Além das cerdas existem nos primeiros 25 artículos, ao lado mediano, na ponta apical, 1-2 pequenos espinhos, às vezes em ordem alternada, isto é, ausentes num ou noutro artículo, de maneira que entre os 25 artículos basais, 14 apresentam estes espinhos.

Flagellum secundum também com a imensa maioria de artículos mais longos que largos. Também aqui não se podem contar "coroas" de cerdas. Além do "nodus" pode haver "subnodi".

2º par de pernas com 17+49 artículos nos dois tarsos respectivamente e com 3+3+2+0 acúleos nos ápices do prefêmur, fêmur, da tíbia e do primeiro tarso respectivamente. 2º tarso provido de 28 "estilestes tarsais" (Tarsalzapfen), todos com as mesmas dimensões, curvados para a frente e presentes na face ventral dos artículos 14 a 42.

Prefêmur, no lado ventral, provido de uma quília longitudinal, coberta de cerdas. Lateralmente, ao longo da mesma, já uma fila de espículas, duplas na área apical. As outras carenas longitudinais apenas com cerdas. Fêmur já com algumas filas longitudinais de espinhos e outras somente com cerdas. Tibia e tarsos somente com filas de cerdas.

4º par de pernas com 17+43 articulos tarsais e com 3+3+3+2 acúleos nos prefêmur, fêmur, na tíbia e no fim do 1. tarso e com 20 estiletes (dos articulos 14º ao 34º) no segundo tarso. Prefêmur com 2 a3 fileiras internas de espinhos; o resto cerdas; fêmures com 7 fileiras de espinhos; tibias com 4 fileiras de espinhos; todos os artículos do 1º tarso com 2 a 3 espinhos no ápice.

7º par de pernas com 11+41 artículos nos dois tarsos e com 3+3+3+2 acúleos e com 18 (do 16º ao 34º) estilites no segundo tarso. 3 Fileiras de espinhos no prefêmur, 7 no fêmur, 5 na tibia e com 2 a3 espinhos apicais em todos os artículos do primeiro tarso.

12º par de pernas com 10+41 artículos nos dois tarsos e com 3+3+3+2 acúleos. Sem estiletes tarsais. Com 3 fileiras de espinhos no pre-fêmur; 7 no fêmur, 5 na tibia e com 2 a 3 espinhos apicais em todos os artículos do primeiro tarso.

Ultimo par de pernas com 13 artículos no primeiro tarso e numerosissimos no segundo, apresentando também os articulos basais do segundo tarso espinhos apicais.

Placa cefálica sem espículas e apenas com poucas e diminutas cerdas; primeiros tergitos já com algumas espículas e cerdas, aumentando tanto as espículas como as cerdas nos tergitos seguintes. Nas bordas laterais o primeiro tergito só apresenta cerdas; 2º tergito já com algumas pequenas espículas no dorso, também na faixa amarela, tendo cada espícula uma cerda longa do lado. Carenas só com cerdas; apenas nos cantos posteriores há um começo de espículas, ainda muito pequenas. Do 3º ao último tergito aumenta o número de espículas, tanto na área mediana como nas carenas laterais, diminuindo, entretanto, as dimensões das cerdas. As espículas das carenas vêm a formar verdadeiras serrilhas (vide fig.1).

Gonópodos das fêmeas: — (vide fig. 2) Lados externos do pro-mes-e metartron formando duas paralelas; lados externos do mes-e metartron aproximadamente do mesmo comprimento, sendo cada um duas vezes mais longo do que a sutura mediana do proartron e tres vezes mais longo do que a base do proartron. Em repouso esta cavidade forma um oval muito oblongo, tocando-se quase os feixes de pêlos no ápice interno do mesartron. Bordos internos do mes-e metartron lisos. Gonópodos apenas com cerdas, sem espículas.

Tipo: — Fêmea, Nº 695 da coleção de Marcuzzi, Caracas, Venezuela.

Procedencia: — Rancho Grande, Venezuela.

Paratipo: — Nº 40, da coleção dos *Scutigeromorpha* do Instituto Butantan, procedente do local-tipo.

A presente espécie nova é indubitavelmente do gênero *Brasilophora* Bücherl, 1939, pois apresenta 2 acúleos no fim do primeiro tarso já desde o segundo par de pernas como também cúspides no segundo tarso das pernas I a 8, todas do mesmo tamanho e sem serem alternadas. Seus últimos tergitos têm as carenas laterais serrilhadas, com cerdas na base de cada espícula.

Brasilophora trimarmorata, sp.n., distingue-se, entretanto, facilmente das duas espécies, *Br. margaritata* e *Br. paulista* Bücherl, 1939, pelos sintelopoditos gonopódicos das fêmeas, como se pode ver da seguinte comparação: —

Brasilophora margaritata	*Brasilophora paulista*	*Brasilophora trimarmorata*
Mes-e metartron do mesmo comprimento; proartron apenas pouco mais curto que o mesartron; cavidade mesartral mais mais larga que longa	Pro-mes-e metartra do mesmo comprimento; cavidade mesartral quase 2 vezes mais longa que larga.	Mes-e metartra do mesmo comprimento; proartron 2 vezes mais curto que o mesartron; cavidade mesartral pelo menos 3 vezes mais longa que larga.
Tergitos castanhos, com faixa mediana avermelhada; pernas amarelas, enfumadas.	Tergitos castanhos, com faixa mediana amarela. Pernas escuras com 3 manchas amarelas .	Tergitos marrom, com larga faixa amarela; nos cantos anteriores igualmente u'a manchinha amarela. Pernas com manchas amarelas.

Ordem: — SCOLOPENDROMORPHA

Fam.: — *SCOLOPENDRIDAE*

Subfam.: — *SCOLOPENDRINAE*

Genus: — *CORMOCEPHALUS* Newport, 1844 *et* 1845

2. *Cormocephalus impressus impressus* Porat, 1876

Uma fêmea adulta, procedente de Rancho Grande, Venezuela e com o N.° 1847. Um filhote, também de Rancho Grande, com o N.° 215. Ambos na coleção do prof. Marcuzzi, Caracas.

Subfam.: — *OTOSTIGMINAE*

3. *Otostigmus pococki* Kräpelin, 1903

11 exemplares, procedentes de Rancho Grande, Venezuela, sendo os dos N°s 1249, 1300, 921, 549 e um sem numero, da coleção do prof. Marcuzzi, Caracas e os de N° 606, 607 e 608 da coleção quilopódica do Instituto Butantan.

A confrontação morfológica destes exemplares com *O. pococki* oferece as seguintes discordâncias: —

O. pococki	*Estes exemplares*
Cabeça e 1º tergito azul-amarelados; todo o resto azul esverdeado.	Inteiramente oliváceo, prevalecendo ou o verde ou o azul ou o roxo.
2 ¼ artículos basais das antenas sem pêlos.	Somente os dois primeiros sem pêlos.
Tergitos sulcados e carenados desde o quinto até ao vigésimo e 21º.	Desde o 3º apenas 2 sulcos curtos anteriores; desde o 4º ou 5º também com 2 sulquinhos leves posteriores; desde o 7º ou 8º com sulcos completos, reforçados sempre na frente e atrás e no meio tão leves que se tornam quase imperceptíveis em muitos tergitos. Carenas laterais somente no 21º; nos 13 tergitos anteriores as bordas laterais são elevadas, simulando muito imperfeitamente "pseudo carenas". Só com espículas e rugas, mas sem quilias.
21º tergito ainda com 3 quilias enrugadas, nos dois terços anteriores. Esternitos com 3 cavidades anteriores e 3 posteriores; as anteriores oblongas, as posteriores redondas; os esternitos posteriores confluem as tres anteriores.	As 6 cavidades são nitidas até ao 20º esternito (vide fig. 3), sendo as 2 da linha mediana as mais profundas. As 6 se encontram numa depressão grande.
21º esternito sem depressão.	Com depressão na segunda metade (fig. 3).
1º par de pernas com 2; 2º ao 19º par com 1 esporão tarsal.	1º ao 3º ou 4º par com 2; daí ao 20º com 1 esporão tarsal.

Estas diferenças morfológicas são realmente bem significativas; ainda mais, porque elas se manifestam em todos os 11 exemplares de Rancho Grande que, do outro lado, mostram uma surpreendente concordância morfológica entre si.

Entretanto, há também caracteres morfológicos comuns entre a espécie de Kräpelin e estes exemplares e nós julgamos estes de natureza relevente.

Assim, desde o 5º tergito há nas duas formas 1 quilia mediana; desde o 7º tergito surgem ao lado desta quilia mediana mais duas quilias laterais, entre os dois sulcos paramedianos e desde o 11º ou 12º surgem mais duas quilias colaterais, ao lado dos sulcos paramedianos, de maneira que existem, ao todo, 5 quilias. Além disso apresentam os tergitos espiculas e rugas granuladas.

As 6 concavidades dos esternitos também são, em suma, concordantes, si bem que estas não oferecem caracter especifico, muito seguro, porque existem muitas outras espécies deste gênero com 6 cavidades.

Assim não nos aventuramos a designar uma espécie ou raça própria para estes 11 indivíduos de Rancho Grande. Seriam necessários mais exemplares, talvez em melhor estado de conservação, para se poder ver com certeza os sexos. Nos presentes, apesar de cuidadosa preparação, não conseguimos isolar nem testiculos, nem ovarios, pois internamente só existia uma massa indistinta. Caracteres sexuais externos, como apófises, com feixes de pêlos, no lado interno dos prefêmures do último par de pernas, também não temos encontrado em nenhum exemplar.

As espécies americanas do gênero *Otostigmus* atingem hoje perto de 35. Entre estas as seguintes apresentam um nítido parentesco morfológico, expresso:

1º pelas 6 cavidades redondas, pequenas nos esternitos;

2º por 1 ou 3 ou 5 quílias nos tergitos, com todas as transições, isto é, pode existir apenas uma quília mediana. Ao lado desta pode haver apenas começo de duas quílias laterais, ainda dentro da área dos dois sulcos (*O. scabricauda* e *inermis*), ou as duas laterais já estão completamente evoluidas, tão longas quanto a mediana (*O. denticulatus* e *casus*). Finalmente, pode haver, ao lado das duas quílias laterais, além dos dois sulcos, mais duas quílias, uma em cada lado, ou incompletas (*inermis*) ou nitidamente desenvolvidas (*pococki* e *occidentalis*).

3º por apresentarem uma área nos tergitos, não lisa, mas desfeita em inúmeras "ruguinhas", como que granuladas, havendo numerosas espículas.

4º pelo dimorfismo sexual entre machos e fêmeas, já quase descrito para todas as especies e a manifestar-se da seguinte maneira: os machos apresentam no lado interno dos prefêmures do último par de pernas um apêndice, mais ou menos articulado, truncado na ponta distal, onde há uma diminuta depressão, coberta de um feixe de cerdas louras.

Este apêndice ora é do mesmo comprimento do prefêmur (*O. silvestrii, scabricauda, clavifer*), ora é um pouco mais curto (*O. insignis*), ora está apenas indicado (*O. pococki*). Finalmente foram descritas ainda espécies, onde está inteiramente ausente (*O. rex, spiculifer, denticulatus, inermis, casus, occidentalis* e *suitus*), fazendo-se necessária, sem mais nada, uma revisão cuidadosa destas últimas espécies, para afastar a dúvida de que os poucos exemplares conhecidos (às vezes apenas um) não sejam representantes exclusivamente do sexo feminino.

As espécies em questão são as seguintes: —

O. pococki Krpln., 1903	Guiana brasileira;
O. insignis Krpln., 1903	Ecuador;
O. silvestrii Krpln., 1903	Ecuador;
O. scabricauda (H. &S., 1870)	Brasil, Colômbia, Guatemala;
O. rex Chamb., 1914	Brasil central e norte;
O. spiculifer Poc., 1893	Ilha de St. Vincent;
O. denticulatus Poc., 1896	México;
O. inermis Por., 1876	Argentina, Venezuela, Colômbia;
O. casus Chamb., 1914	Brasil, Mato Grosso, rio Madeira;
O. occidentalis Mein., 1886 ..	
O. suitus Chamb., 1914	Brasil, Mato Grosso, rio Madeira.

Passando estas 11 espécies por uma análise mais acurada, chega-se às seguintes conclusões: —

a) *O. occidentalis* e *suitus* foram descritos apenas sumariamente e de uma maneira muito imperfeita, precisando ser revistos à mão de novo material, da mesma procedência. *Suitus* sinônimo com *casus?*

b) *O. insignis* e *silvestrii* formam certamente apenas uma espécie, talvez com 2 ou 3 raças.

c) *O. rex* não é outra coisa, como já afirmara C. Verhoeff, senão a fêmea de *O. scabricauda,* do qual, aliás, muito dificilmente se poderão separar morfologicamente as fêmeas de *spiculifer* e *denticulatus.*

d) *Otostigmus inermis* deverá igualmente ser revisto mais de perto, segundo as zonas geográficas. Foi ele assinalado na Argentina, depois na Venezuela e, finalmente, na Colombia; portanto em locais bastante distantes, pelo menos quanto à Argentina. Morfologicamente há igualmente variações assinaladas, principalmente quanto aos 2 esporões no fim do primeiro tarso que podem estar presentes apenas nos primeiros 4 pares ou em 18 pares.

Quanto às quilhas dos tergitos há uma mediana, realmente bem saliente. Ao lado desta há rugas longitudinais, espiculadas, em número de 2 em cada lado da quilia, de maneira que ao todo seriam 5 elevações, mais ou menos nítidas. Já vimos que *pococki* apresenta 5 quilias nítidas, espiculadas; mas apenas 2 esporões tarsais somente no 1º par de pernas. Os exemplares, entretanto, de Rancho Grande, Venezuela e que nos deram ocasião a estas insinuações de ordem morfológica, já apresentam 2 esporões tarsais nos primeiros 3 a 4 pares de pernas, como alguns exemplares de *inermis*. Em alguns indivíduos as quilias laterais também são mais débeis; no último tergito, finalmente, não há nestes exemplares as 3 quilias, assinaladas no tipo de *O. pococki,* mas apenas espículas como em *inermis*.

Não se incorreria, portanto, em erro muito grave, si se pretendesse reunir as duas espécies: *O. pococki* e *inermis*, numa só espécie, sendo a *pococki* apenas o macho de *inermis*, com precedência do nome de *inermis*. Ou, então, poderia esta espécie ser subdividida em raças geográficas, designando-se igualmente uma raça venezuelana.

Estas considerações serão certamente resolvidas praticamente, após uma comparação de maior número de exemplares. Por ora, apesar das divergências morfológicas entre os indivíduos de Rancho Grande com *pococki*, as consideramos como pertencendo a esta espécie.

Fam. CRYPTOPIDAE

Subfam.: — *SCOLOPOCRYPTOPINAE*

Genus: — *Otocryptops* Haase, 1886

4. *Otocryptops melanostomus* (Newp., 1845)

5 exemplares, de Rancho Grande, Venezuela, tendo sido um incorporado à coleção quilopódica do Instituto Butantan, sob o N° 605.

5. *Otocryptops ferrugineus ferrugineus* (L., 1767)

1 exemplar, de Rancho Grande, Venezuela, na coleção do prof. Marcuzzi, sob o N° 949.

Genus: — *Newportia* Gervais, 1847.

6. *Newportia pusilla* Poc., 1893

6 exemplares, de Rancho Grande, Venezuela, sendo 2 na coleção do prof. Marcuzzi, em Caracas (N- 1096 e 7-49) e 4 na coleção quilopodica do Instituto Butantan, sob o N° 609.

Medidas: — comprimento total até 34 mm.

Última perna-prefêmur	2,5	mm;
fêmur	2,4	mm;
tibia	2,2	mm;
tarso 1	1,2	mm;
tarso 2	7,0	mm.

Placa cefálica totalmente sem sulcos. Primeiro tergito com sulco anular, mas sem sulcos longitudinais. Tergites 4-20 com 2 sulcos longitudinais colaterais

e 2-21 com 2 sulcos medianos. Quília mediana dos tergitos bastante indistinta. Esternitos com sulco mediano, sem atingir as bordas anterior e posterior e ainda 2 sulcos laterais anteriores que vão apenas até a metade de cada placa. Tíbias somente com esporão lateral; tarsos sem esporões. Apêndice coxopleural muito agudo, cônico, terminando num espinho. Poros grandes, atingindo na frente quase a margem do tergito. No canto posterior um espinho muito pequeno. Prefêmur das últimas pernas com 4 a 5 espinhos ventrais; fêmur com 1 a 2 espinhos mediais, pequenos.

Antenas com 17 artículos; segundo tarso das últimas pernas com 10 a 16 artículos, geralmente com 10.

7. *Newportia longitarsis longitarsis* (Newp., 1845)

4 exemplares, de El Funquito, Rancho Grande, Venezuela, ficando o de 5-49 na coleção do prof. Marcuzzi, Caracas, e os outros na coleção quilopódica do Instituto Butantan, sob o N° 610.

Os 4 exemplares apresentam diferenças morfológicas relevantes de *N. l. longitarsis*, de maneira que preferimos fornecer a descrição dos mesmos: —

Medidas: — comprimento total, até 40;

placa cefálica e 1° tergito-		2,0 mm;
antenas-		1,8 mm;
última perna:	prefêmur-	1,2 mm;
	fêmur-	1,1 mm;
	tíbia-	1,0 mm;
	tarso 1-	0,6 mm;
	tarso 2-	1,5 mm.

Placa cefálica lisa, brilhante, esparsamente pontuada, com dois sulcos posteriores, muito curtos e divergentes (fig. 4). Antenas com 17 artículos, não atingindo a borda posterior do 1° tergito. Os 3 artículos basais esparsamente pilosos Coxosternum forcipular na margem anterior bilobado. Primeiro tergito com fossa anular e bem no meio uma cavidade nítida, semi-circular (fig. 4). Com 2 sulcos longitudinais até a fossa (não em sua frente). Tergitos 2-22 com dois sulcos longitudinais e sulcos laterais, anteriores do 3° ao 20° tergito. Do 6° ao 20° uma quília mediana que não atinge as bordas anterior e posterior. Coxosternum sem sulcos longitudinais ou transversais. Esternitos com sulco mediano, abreviado em frente e atrás e na segunda metade do corpo com dois sulcos laterais anteriores. Último esternito sem sulco ou depressão; atrás truncado. Pernas com cerdas finas; tíbias só com esporão lateral; os dois tarsos

nitidamente divididos, mas sem esporão. Tarsos nitidamente divididos, sem esporão. Apêndices coxopleurais longos, cilíndricos, terminando em ponta (fig. 5). Poros muito grandes, mas relativamente pouco numerosos, não atingindo os tergitos nem a borda posterior (fig. 5). Prefêmur último com 4 espinhos ventrais grandes; sem outros espinhos: fêmur com 2 espinhos mediais, menores; tíbia sem espinhos, segundo tarso apenas com 6 artículos.

Ha diferenças nitidas entre estes exemplares e a espécie, *N. longitarsis, longitarsis*. Esta última apresenta os dois sulcos da placa cefálica, indo até a metade, enquanto que nos exemplares de Rancho Grande ocupam apenas a quarta parte posterior; no primeiro tergito não há em *l. longitarsis* a depressão atrás da fossa e os dois sulcos se estendem ainda além desta; a área porosa é grande, atingindo os poros na frente as margens do tergito; no último prefêmur existem, além dos espinhos ventrais, grandes, duas fileiras de pequenos espinhos menores. Quanto ao resto há concordância entre os indivíduos da Venezuela e a *N. l. longitarsis*, razão porque os agrupamos nesta espécie.

SUMÁRIO

Uma pequena coleção de quilópodos, vindos da Venezuela e coletados em Rancho Grande e enviados ao Instituto pelo prof. Marcuzzi, é descrita, contendo as seguintes espécies: —

Brasilophora trimarmorata sp. n.;
Cormocephalus impressus;
Otostigmus pococki:
Otocryptops melanostomus;
Otocryptops ferrugineus ferrugineus;
Newportia pusilla;
Newportia longitarsis longitarsis.

ABSTRACT

This paper is a report on centipeds taken in the locality "Rancho Grande", Venezuela by Prof. Dr. Marcuzzi, Caracas. The following species are listened: —

Brasilophora trimarmorata sp. n.;
Cormocephalus impressus;
Otostigmus pococki;
Otocryptops melanostomus;

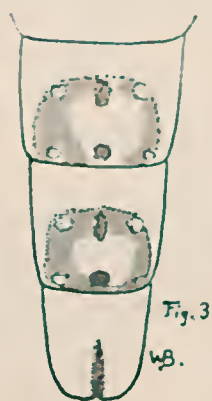
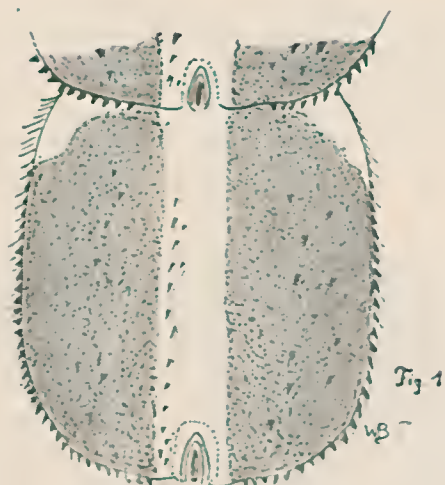
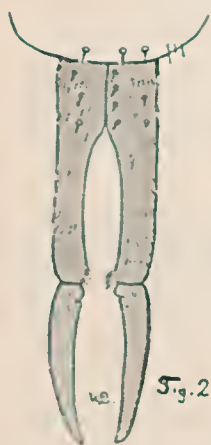
Otocryptops ferrugineus ferrugineus;
Newportia pusilla;
Newportia longitarsis longitarsis.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine kleine Chilopodensammlung des H. Prof. Dr. Marcuzzi, aus Caracas, Venezuela, wird beschrieben. Fast alle Tiere stammen aus der Nähe von Rancho Grande. Folgende Arten befanden sich darunter: —

Brasilophora trimarmorata sp. n.
Cormocephalus impressus;
Otostigmus pococki;
Otocryptops melanostomus;
Otocryptops ferrugineus ferrugineus;
Newportia pusilla;
Newportia longitarsis longitarsis.

Von den schon bekannten Arten wurden die Exemplare von *O. pococki*, *N. pusilla* und *N. l. longitarsis* vollständig beschrieben, da sie von den genannten Arten morphologisch sehr abweichen und sich deshalb nicht genau einreihen lassen.

Fig. 1
W.B.
Fig. 2
W.B.
Fig. 4
W.B.
W.B. Fig. 5
Fig. 3
W.B.

ANTIGENOS DE SALMONELA EM BACILO FLEXNER II (*)

POR JANDYRA P. DO AMARAL & MARIA B. ESTEVES
(Laboratorio de Bacteriologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil.)

Na família das Enterobacteriaceas ao lado dos caracteres bioquímicos, a composição antigênica é de essencial valor na diferenciação dos gêneros, espécies e tipos.

Não muito raramente, porém, têm sido encontrados antígenos inespecíficos em gêneros de bactérias perfeitamente identificados por suas propriedades bioquímicas e sorológicas básicas.

Lembraremos os trabalhos de Banforth (1), estudando raças de *E. coli* aglutináveis pelo anti-sôro de *Shigella alkalescens;* White (2) e Waaler (3), observando aglutinações de salmonelas por sôros disentéricos e vice-versa; Pelufío, Edwards e Brunner (4), referindo amostras de paracolis com antigenos flagelares de *Salmonella.* Entre nós, Taunay e colaboradores (5) publicam, em 1948, observações de amostra Flexner II que possue em seu soma o antígeno IX de *Salmonella.*

Queremos referir em destaque o trabalho de Borustein, S., Saphra, I. e Daniels, J. B. (6) que, estudando a presença dos antigenos VI e XIII em *Shigella paradysenteriae* do "grupo Y" (bacilo de Hiss) falam da possibilidade dêstes antigenos serem característicos dessa espécie. Esta questão é levantada pelo fato de terem aqueles autores verificado a ocorrência dos antigenos VI e XIII em 14 de 16 cepas de "Flexner Y" experimentadas.

Referem ainda como característica a inexistência de tais antigenos em 2 cepas de *Shigella sonnei* e em 5 de *Sh. paradysenteriae* não pertencentes ao grupo .

Nossa comunicação estuda a presença dos antigenos VI e XIII de *Salmonella* em uma cepa com todos os caracteres essenciais do Bacilo Flexner II.

Esta cultura foi estudada a pedido do dr. M. Murgel que a isolou das fezes de uma creança, cuja ficha clinica é a seguinte:

Recebido para publicação em 23 de maio de 1950.

(*) Trabalho apresentado na IIIª Reunião Conjunta das Sociedades de Biologia do Brasil. Bahia, Agosto, 1949.

Hospital Santa Cruz.

V. Y. 6 anos — Brasileiro. Procedente de Itaquera e internado em 1-4-948 em estado de onconsciência e com rigidês da nuca. Até às 17 horas do dia da internação, conforme informação do pai, nada de anormal fora notado. Nesta tarde, o menino apresentou estado convulsivo, sendo levado ao Hospital onde deu entrada às 21 horas.

A creança faleceu antes das 24 horas deste mesmo dia. Retirado o liquor por punção lombar e centrifugado, com seu sedimento foi feita uma preparação que, corada pelo método de Gram, revelou ao exame microscópico bastonetes gram-negativos. Infelizmente, não foi feita cultura deste material. Das fezes foi isolado germe gram-negativo, o qual foi enviado ao Instituto Butantan para identificação.

Estudos sobre a cepa em questão: Bacilo Flexner N.º 38

Bacilos gram-negativos. Imóveis. Propriedades bioquímicas: fermenta a maltose, glicose e manita sem formação de gás; não ataca a lactose e a glicerina. Não produz indol, nem liquefaz a gelatina. Não ataca a ureia (S.V-); não produz aldeido fórmico (Stern-), nem H^2S.

O quadro 6 especifica o total das reações bioquímicas.

Propriedades antigênicas — Aglutina os sôros Flexner totais, e em particular o sôro específico para Flexner II como mostra o quadro 1:

QUADRO 1

Titulos aglutinantes da cepa Flexner N.º 38 para sôros Flexner

Soro anti-	Antígeno	Titulo
Flexner I (não absorvido)	N.o 38	5.120
Flexner II (não absorvido)	N.o 38	5.120
Flexner Y (não absorvido)	N.o 38	2.560
Flexner fator II, puro (*) (absorvido)	N.o 38	640

A aglutinação rápida, em placa, da cepa 38 com um sôro polivalente anti-salmonela, levou-nos a estudar os antígenos responsáveis pela reação. Experimentados numerosos antisoros somaticos e flagelares, verificou-se aglutinação apenas com os sôros somáticos VI e XIII.XXIII. O quadro 2 mostra o título das dosagens pelo método lento.

Os testes de absorção especificam e confirmam a presença dos antígenos VI e XIII, como se pode verificar pelo quadro 3.

(*) Cedido gentilmente pelo Dr. A. Taunay, do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

QUADRO 2

Título lento da cepa N.º 38 com antisôros de salmonelas e de Flexner II

Soro preparado com amostra	Antigeno 38
Flexner II	5.120
S. paratyphi C VI.VII	1.280
S. worthington I. XIII.XXIII	2.560

QUADRO 3

Testes de absorção

Antisôros	Aglutininas	Titulos aglutinantes				
		Flexner 38	*S. paratyphi C* (VI.VII)	*S. newport* (VI.VIII)	*S. bovis morbificans* (VI.VIII)	*S. litchfield* (VI. VIII)
S. paratyphi-C	VI.VII	1.280	5.120	640	320	1.280
S. paratyphi-C absorvido com Flexner 38		<50	320	<50	<50	<50
		Flexner 38	*S. worthington* (I.XIII.X XIII)	*S. poona* (XIII.XXII)		
S. worthington	I.XIII.XXIII	2.560	2.560	1.280		
S. worthington absorvido com Flexner 38		50	320	<50		

O quadro 4 mostra ainda reações de absorção, que confirmam a existência do antigeno XIII.

QUADRO 4

Antisôro	Aglutininas	Titulos aglutinantes		
		Flexner	*S. worthington* (I.XIII.XXIII)	*S. poona* (XIII.XXII)
S. worthington	(I.XIII.XXIII)	2.560	2.560	1.280
S. worthington absolvido com *S. poona*		<50	640	<50

Tendo sido preparado em coelho um sôro com Flexner 38, obtivemos títulos bem expressivos com as culturas que possuem antigenos VI e XIII, como se verifica no quadro 5:

QUADRO 5

Titulos aglutinantes para sôro de coelho imunizado com a cepa 38

Antigenos	Titulos
Flexner 38	5.120
S. paratyphi C (VI.VII)	640
S. muenchen (VI.VIII)	320
S. glostrup (VI.VIII)	320
S. potsdam (VI.VIII)	320
S. virchow (VI.VII)	320
S. worthington (I.XIII.XXIII)	320

Ficou provado portanto, por testes de aglutinação, absorção, e produção de anticorpos, a presença dos antígenos VI e XIII na cepa Flexner 38.

Estas verificações foram feitas no início de 1948. Terminadas as provas já referidas, a amostra ficou conservada na coleção de culturas do laboratório em tubos de agar simples recobertos com vaselina e à temperatura ambiente.

Quando, em início de 1949, coordenavamos os nossos protocolos para publicação, ao repetirmos as provas sorológicas, verificamos que, apezar das propriedades morfológicas e bioquimicas se haverem conservado inalteradas, (quadro 6), o mesmo não acontecera com a parte sorológica. Assim é que os titulos aglutinantes da amostra para os sôros de salmonelas (VI e XIII), a principio altos, haviam caído sobremaneira. Pelo quadro 7 pode-se ver que os antígenos essenciais para Flexner II se conservaram intactos o mesmo não acontecendo para os antigenos de salmonelas que se mostraram labeis.

Por passagens sucessivas em camundongos, entretanto, os títulos para os antígenos VI e XIII se elevaram novamente, subindo quase ao nível inicial.

Pelo exposto parece licito concluir que os antígenos de salmonela VI e XIII encontrados na cepa estudada, são mais lábeis que os antigenos major para Flexner II, recuperando-se, entretanto, mediante o rejuvenescimento da amostra por passagens repetidas em camundongos. Esta ultima verificação sugere que a ocorrência daqueles antigenos de salmonela esteja em relação com a virulência do micro-organismo.

QUADRO 6

Propriedades bioquímicas da cepa 38, recém-isolada, envelhecida e rejuvenescida por passagens em comundongos.

	Cepa 38		
	Recém-isolada	Envelhecida	Rejuvenescida
Glicose	A	A	A
Manita	A	A	A
Lactose	—	—	—
Sacarose	—	—	—
Maltose	A	A	A
Dulcita	A	A	A
Arabinose	A	A	A
Galactose	A	A	A
Adonita	—	—	—
Salicina	—	—	—
Inosita	—	—	—
Sorbita	—	—	—
Celobiose	—	—	—
Manose	A	A	A
Trealose	A	A	A
Xilose	A	A	A
Indol	+	+	+
H^2S	—	—	—
Glicerina	—	—	—

QUADRO 7

Títulos aglutinantes obtidos com a cepa 38 recem-isolada, envelhecida e após passagem em camundongo.

	AMOSTRA FLEXNER 38								
	Recém-isolada			Conservada em cultura cerca de 1 ano			Rejuvenescida por passagens em camundongos		
Antígenos:	Fl. II	S. VI	S. XIII	Fl. II	S. VI	S. XIII	Fl. II	S. VI	S. XIII
Títulos aglutinantes:	5.120	1.280	2.560	5.120	50	50	5.120	640	1.280

RESUMO

Foi demonstrada a presença dos antígenos VI e XIII de salmonelas em uma cultura com os caracteres essenciais de *Shigella paradysenteriae* II.

Tais antígenos VI e XIII, bem mais lábeis que os antígenos major para Flexner II, parecem estar condicionados á virulência do germe.

ABSTRACT

Salmonella antigens VI and XIII were identified in a strain which presented essential characters of *Shigella paradysenteriae* II.

These antigens VI and XIII, much more labil than the antigens major of Flexner II, seem to depend on the virulence of the strain.

BIBLIOGRAFIA

1. *Bamborth, J.* — J. of Hygiene 34:69-80, 1934.
2. *White, P. B.* — J. of Path. & Bact. 32:85-94, 1929.
3. *Waaler, E.* — Monograph. Oslo, 1935.
4. *Peluffo, C. A.; Edwards, P. R. & Bruner, D. W.* — J. Inf. Dis. 70:185-192, 1942.
5. *Taunay, A. E. et colab.* — O Hospital 33:211, 1948.
6. *Bornstein, S.; Saphra, I. & Daniels, J. B.* — J. of Immunology 42:401, 1941.

REAÇÕES DA PRECIPITINA EM ALGUNS CULICIDAS (*)

POR JANDYRA P. DO AMARAL & ARACY A. AGUIAR

(Do Laboratorio de Bacteriologia do Instituto Butantan e Serviço da Profilaxia da Malária, S. Paulo, Brasil)

No estudo dos mosquitos hematófagos as provas de precipitina apresentam interesse, pois indicam a preferência, ou mesmo a exclusividade de certas espécies em sugar êste ou aquele animal, ou mesmo o homem, minúcias de importância para os trabalhos epidemiológicos em geral.

Nas pesquisas do serviço de malária este teste é usado com muita frequência pois selecionando as fêmeas que se alimentam de sangue humano estabelece a base para os estudos da transmissão e profilaxia da moléstia.

A técnica clàssicamente usada, a que se encontra descrita em quase todos os trabalhos sôbre o assunto, insiste sôbre estes detalhes: "Selecionam-se sómente fêmeas engorgitadas recentemente e com abdomen cheio e vermelho indicando terem se alimentado há pouco tempo. Os especimens são capturados pela manhã evitando desta maneira o mais possível a digestão do sangue. Logo após a coleta cada especimen é amassado em um papel de filtro, devidamente fichado, e enviado ao laboratório para que se processem as reações" (1).

Esta técnica tão simples a primeira vista apresenta algumas dificuldades para o nosso meio pois a mutilação do mosquito necessitando ser feita no momento da captura, as mais das vezes em lugares distante do laboratório central, traz como consequência prejuizo para certos estudos entomológicos que só poderão ser realizados nos laboratórios centrais. Tendo em vista esta questão, seria interessante a captura do mosquito nas zonas a estudar e a remessa íntegra dos mesmos ao laboratório central.

Tentando uma idéia sôbre êste detalhe resolvemos verificar, se era possível a realização das provas de precipitinas com mosquitos conservados íntegros durante um prazo de tempo razoável para serem remetidos ao laboratório, mesmo se capturados à distância e desta maneira estudados sob outros aspéctos antes de serem inutilizados para as provas.

Entregue para publicação em 23 de maio de 1950.

(*) Trabalho apresentado á Sociedade de Biologia, em reunião de 12-4-1950.

Verificamos ainda da possibilidade do mosquito ser conservado vivo durante um tempo mais ou menos longo após o repasto, sem prejudicar a positividade do teste, demonstrando a proteina humana mesmo depois de digerida.

Esta é a finalidade da presente comunicação.

Parte experimental:

Foram criados no laboratório (Serviço de Profilaxia da Malária; Laboratório de Entomologia) e alimentados com sangue humano exclusivamente, fêmeas de mosquitos que são mortas 12 horas após o repasto. Selecionam-se as engorgitadas.

Divididas em 20 lotes serviam para as provas de precipitinas em intervalos de tempo variáveis a saber: 12-24-48-72 horas — 10-20-30-35-40-45 dias e 3-4-5-6-7-8-9-10-11-12 meses.

Os mosquitos devidamente fichados foram conservados integros só sendo triturados no dia da prova em tubo com 0,5 cm^3 de solução fisiológica. Este triturado depois de permanecer 1 hora à temperatura ambiente era passado em papel de filtro obtendo-se então um liquido absolutamente transparente.

As reações foram efetuadas em tubos de 0,5 x 4 cm com partes iguais do antígeno e do sôro anti-humano (0,05 + 0,05).

O sôro empregado foi preparado por nós (Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan) em coelhos, aos quais foram injetados por via endovenosa uma média de 18 cm^3 de sôro humano em 10 injeções, iniciando-se com 0,1 e terminando-se com 4 cm^3 e intervaladas de 3 dias. O menor título de sôro aproveitado foi de 1:20.000.

O sôro era colocado na parte inferior do tudo e o antigeno cuidadosamente escorrido pelas paredes do mesmo de maneira a se formar uma zona de união e na qual se verifica a formação de anel leitoso indicando a positividade da reação. As leituras foram feitas entre 5 e 10 minutos e para as reações positivas já com 5 minutos dá-se o aparecimento de anel bem nítido que se acentua até 10 minutos. Em alguns casos os tubos foram levados à estufa a 37° até 20': em alguns tubos verifica-se a intensificação do anel, mas julgamos esta etapa absolutamente óbvia pois as leituras podem ser feitas com toda a segurança até 10 minutos. O quadro No. 1 especifica os resultados obtidos:

Pela verificação do quadro No. 1 nota-se que até 1 ano (o máximo tempo examinado) é possivel se conservar o mosquito integro sem afetar a positividade da reação que para todos os casos se mostrou absolutamente típica e de facil leitura.

QUADRO 1

Reações de precipitinas em mosquitos mortos 12 horas após o repasto (sangue humano) e triturados no momento da prova.

Mesquitos examinados depois de	N.ºs de exemplares	Leitura da reação 5'	10'	Estufa 37° 20'
12 horas	15	4+ 11++	15++	
24 horas	8	3+ 5++	5++ 3+++	
48 horas	8	3+ 5++	3++ 5+++	
72 horas	10	10+++		
10 dias	10	1++ 9+++	1++ 9+++	
20 dias	4	1++ 3+++	1++ 3+++	
30 dias	12	1++ 11+++	12+++	
35 dias	7	1++ 6+++	1++ 6+++	
40 dias	10	2++ 8+++	1++ 9+++	
45 dias	10	1+ 3++ 6+++	2++ 8+++	
2 meses	12	1+ 2++ 9+++	1+ 2++ 9+++	
3 meses	10	4+ 6++	4+ 6++	3+ 5++ 2+++
4 meses	15	15+	10+ 5++	9+ 6++
5 meses	14	13+ 1++	11+ 3++	11+ 3+++
6 meses	30	29+ 1++	19+ 11++	3+ 23++ 4+++
7 meses	25	19+ 6++	11+ 14++	3+ 16++ 6+++
8 meses	10	7+ 3++	[illegible] 7++	1+ 8++ 1+++
9 meses	29	22+ 7++	2[illegible] 9++	16+ 8++ 4+++
10 meses	16	16+	16+	14+ 2++
11 meses	14	14+	14+	1+ 8++ 5+++
12 meses	45	37+ 8++	35+ 10++	20+ 21++ 4+++
Total exs.	314			
Total exs. positivos	314			

Legenda + = anel pouco intenso
++ = anel intenso
+++ = anel muito intenso

O segundo aspécto da questão estudada foi se o mosquito conservado vivo por tempo maior que 12 horas após o repasto, poderia revelar a proteina humana em seu organismo, mesmo após a digestão do sangue ingerido.

Mosquitos alimentados exatamente como para o primeiro lote foram sacrificados após 24-36-48-64 horas e 3 dias após o repasto e as reações feitas pela mesma técnica citada. O quadro No. 2 mostra os resultados encontrados:

Examinando-se o quadro N.º 2 chega-se à conclusão que ainda com 3 dias após a alimentação (máximo de tempo de verificação) a proteina humana é revelada pelos testes. Devemos porém chamar a atenção que nesta segunda série de reações, isto é, com mosquitos mortos 24 horas ou mais, após o repasto, aparece com frequência, uma turvação na parte liquida superior ao anel, turvação esta que não foi notada em nenhuma das reações do primeiro lote de mosquitos mortos 12 horas depois de terem sido alimentados.

QUADRO 2

Testes de precipitina realizados para mosquitos alimentados com sangue humano e mortos em tempos variáveis

Tempo de vida aós o repasto	N.° de exemplares	Leitura da reação		
		5'	10'	Estufa 37° 20
24 horas	48	40 + 6 + + 2 + + +	35 + 10 + + 3 + + +	20 + 19 + + 9 + + +
36 horas	24	9 + 15 + +	9 + 15 + +	5 + 15 + + 4 + + +
48 horas	22	18 + 3 + + 1 + + +	18 + 3 + + 1 + + +	12 + 8 + + 2 + + +
64 horas	5	3 + 2 + +	3 + 2 + +	1 + 2 + + 3 + + +
3 dias	11	11 +	11 +	5 + + 3 + 3 + + +
Total exs.	110			
Total exs. positivos ..	110			

Esta turvação não prejudica a leitura dos testes pois o anel é bem nítido como se poderá verificar pela fotografia em anexo.

Frizamos porém esta observação, que poderá trazer dúvidas ao técnico pouco acostumado às leituras. Não podemos discutir do carácter da mesma, deixando sómente assinalado o fato.

RESUMO E CONCLUSÕES

1) Trabalhando com mosquitos criados no laboratório e alimentados com sangue humano conclue-se que os testes de precipitina podem ser feitos com mosquitos mortos 12 horas após o repasto e conservados sêcos e íntegros até 1 ano (o maior tempo de verificação).

2) As reações, absolutamente típicas, são lidas com facilidade já com 5 minutos.

3) Com aumento de tempo de vida do mosquito após o repasto (24 horas até 3 dias), as reações ainda se mostram nítidas, aparecendo porém uma zona de turvação na parte superior do anel.

ABSTRACT

In laboratory bred mosquitoes, fed with human blood, the precipitin tests are positive in samples killed 12 hours after feeding and preserved in dried state one year (the largest period observed in the present work).

Typical reactions are easily read within 5 minutes.

Mosquitoes killed 24 hours to 3 days after the blood meal still show clear out reactions, though presenting a zone of turbidity on the upper part of the ring.

BIBLIOGRAFIA

1. *Arnold, E. H.; Simons, S. H. and Fancett, D. G. — Public Health Reports* 61:1244, 1946.
2. *Lloyd, R. B.; Napier, L. E. and Smith, R. O. A. — Indian Journal of Medical Research* 12:811, 1924.
3. *Ferreira, F. Cruz e Ferreira, T. — An. Med. Trop.* 1:289, 1943-44.
4. *Raynal, J. — Bull. Soc. Path. Exotique* 29:56, 1936.

Mem. Inst. Butantan.
22:75-150, Nov.° 1950.

TUBO 1 — Reação típica para teste de precipitina em mosquitos mortos 12 horas após o repasto e conservados secos e íntegros até um ano.
TUBO 2 — Reação onde se nota uma zona de turvação acima do anel, que aparece com o aumento de vida do mosquito após o repasto.